

研究报告 Original Papers

菠萝果实发育相关*RFD1*基因的克隆及表达王尉^{1,2,3}, 张秀梅³, 谢江辉^{3,*}¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥230036; ²中山大学生命科学学院植物与微生物互作实验室, 广州510006; ³中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江524091

摘要: Blast菠萝果实不同发育时期的cDNA文库测序结果, 并用信息生物学软件和相关网站进行拼接和分析, 设计特异引物RT-PCR, 得到一个2 750 bp、编码761个氨基酸的全长基因序列, 命名为*RFD1*。预测该蛋白是一个亲水性、且具有多个磷酸化位点的分泌性蛋白, 可能位于叶绿体中。半定量PCR分析发现*RFD1*基因表达量在果实发育期不断增加, 70 d达到最高; 而在70 d果实的不同部位并没有显著差异性, 仅果实外部略有增高。

关键词: 菠萝; “电子”克隆; 果实发育; 表达

Cloning and Expression of *RFD1* Gene Related to Development from Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] Fruit

WANG Wei^{1,2,3}, ZHANG Xiu-Mei³, XIE Jiang-Hui^{3,*}¹Anhui Agricultural University, School of Life Science, Hefei 230036, China; ²Sun Yat-Sen University, School of Life Sciences, Laboratory of Plant and Microbial Interaction, Guangzhou 510006, China; ³China Southern Subtropical Crop Research Institute of CATAS, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: In this study, cDNA library of pineapple fruit sequences of different development stages were screened by Blast. And then, sequences were spliced and analyzed by some informatics softwares and related webs. According to the spliced result, specific primers of RT-PCR were designed and performed. We got a 2 750 bp of the full length gene encoding 761 amino acids which was named as *RFD1* (related to fruit development). The results indicated that *RFD1* protein was a hydrophilic, multiple phosphorylation sites of the secreted protein, and may be located in chloroplasts. Semi-quantitative PCR analysis showed that *RFD1* gene expression was gradually increased during fruit development periods, and reached the peak in the 70 d. Though the expression of *RFD1* gene in different fruit parts had no significant differences, that in the outer was slightly increased in the 70 d after flowering.

Key words: pineapple (*Ananas comosus*); *in silico* cloning; fruit development; expression

根据果实在成熟期间有无呼吸高峰区, 可将其分为跃变型和非跃变型两类。在呼吸跃迁型水果中, 人们以西红柿作为模式系统做了大量研究, 特别是与果实成熟速率相关的乙烯合成通路和MADS盒转录因子(Vrebalov等2002; Hadfield等2000); 并详细研究了编码乙烯合成通路中的信号分子1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)、ACC合成酶(ACS)及其氧化酶(ACO)的作用机理(Giovannoni 2001)。然而, 在部分非呼吸跃迁型水果中, 尽管对其发育和成熟相关基因做了大量研究, 如葡萄(Davies等2000)、草莓(Aharoni等2002)、柑橘(Moriguchi等1998)、西瓜(Levi等2006)等, 但如何

调控果实成熟的文献甚少(Giovannoni 2004), 故克隆和研究非呼吸跃迁型果实成熟基因显的较为重要。

菠萝是继香蕉和芒果之后的第三大重要的经济作物, 但对其分子遗传特征了解甚少, 特别是果实发育和成熟的相关基因(Botella等2008)。截止2004年, 基因文库中仅登陆51个来自菠萝叶片和营养组织的基因(Moyle等2005a), 其中24个是

收稿 2010-09-28 修定 2010-12-06

资助 “948”项目[2006-G34(A)]、农业部行业计划资助项目(nyhyzx07-030)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(200701)。

* 通讯作者(E-mail: xiejhww@163.com; Tel: 020-39332974)。

Neuteboom等(2002)通过差异显示在根部高量表达的基因,部分基因在果实中也有表达。Moyle等(2005b)首次构建了菠萝果实不同发育时期的cDNA文库并登陆了1 548个EST序列,包括408个绿色果实和1 140个完全成熟的果实,发现2个金属硫蛋白基因(*Ac180*和*Ac181*)、一个含有MADS盒的基因(*Ac146*)、一个蛋白转录因子SUI1 (*Ac75*)和一个60S核糖体蛋白L10 (*Ac8*)基因在果实成熟时表达量上调。而*Ac180*在未成熟和成熟的果实中均有表达,具体作用还有待进一步研究(Moyle等2005a)。

本文利用生物信息学分析已构建的菠萝果实不同发育时期的cDNA文库,对未知基因序列重复同源性检索、拼装,用RT-PCR验证目的基因的正确性,并对该基因和蛋白序列进行分析,预测其不同的理化性质,研究该基因在果实发育过程中的时空表达特征,对提高果实品质和储存周期具有一定理论和实践意义。

材料与方法

供试材料为菠萝品种‘巴厘’ [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. ‘Yellow Mauritius’]不同发育时期的果实,取自中国热带科学院南亚热带作物研究所菠萝资源圃。选择盛花时有代表性的、花期一致的果实挂牌,从谢花后20 d开始,每隔10 d取样1次,每次随机取果5个,直至成熟(2007年4月~6月),共取7次。采后将果实分为4个部分,分别为中部、内部、上部和下部,并用液氮处理放于-80 °C保存备用。

菠萝果实总RNA提取参照王尉等(2007)的方法进行。根据已预测的菠萝未知基因序列,设计特异性引物,上游引物: 5' ATCGGTATTGTGGC-ACTTCTTTGT 3', 下游引物: 5' TGGTTCTCCG-CGTGTACTATGTCC 3', 产物大小约为1 994 bp。用Takara公司生产的mRNA Selective PCR Kit Ver 1.1一步法进行RT-PCR,反应体系为: 2×mRNA Selective PCR Buffer I 25 μL、MgCl₂ 10 μL、dNTP/analog Mixture 5 μL、Rnase inhibitor 1 μL、AMV RTase XL 1 μL、Oligo dT primer 1 μL、混合模板(包括果实不同部位和不同个体的总RNA,约1 μg总RNA) 1 μL、最后加入RNase Free H₂O至总体

积50 μL,扩增程序为50 °C 15 min (反转录); 85 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min,共38个循环;后72 °C总延伸10 min, -20 °C保存备用。反应结束后,取上述扩增产物于含EB的1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳,在凝胶成像系统下观察电泳结果。

回收PCR产物与pGEM-T Vector (Promega公司)连接,转入DH5α中,后酶切鉴定呈送上海生物工程有限公司测序。

在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找最大开放阅读框(ORF); NCBI网站对核苷酸序列进行BLAST分析。理化性质用<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>在线软件分析;蛋白二级结构用http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/npsa/npsa_hnn.html进行预测; Scratch Protein Predictor 预测二硫键位置; NetPhos 2.0 Server程序预测蛋白磷酸化位点;而蛋白质中的信号肽和亚细胞定位分别用<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>和<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>进行在线预测。DNASTar、Primer 5.0和DNAMAN等软件用于序列分析和引物设计。

以菠萝果实18S rRNA看家基因为内参,对*RFD1*基因在果实不同成熟时期和不同部位的时空表达进行研究。依据Chaw等已登录(GenBank登录号D29786)的18S rRNA基因核苷酸序列(约400 bp)设计特异引物,上游引物: 5' TCCGCTGGCAC-CTTATGAGA 3', 下游引物: 5' CGCGTGC GG-CCCAGAACA 3'。*RFD1*半定量表达引物和PCR反应体系均如上所述,采用同管异时扩增目的基因和内参基因。

结果与讨论

1 菠萝果实发育相关基因的“电子”克隆

Blast分析菠萝果实cDNA文库测序结果,得出49个未知功能的EST序列,设定搜索标准为: Highly similar sequences (megablast)选取长度≥100 bp,相似性85%以上,将所得序列在国际生物技术信息中心的GenBank数据库nucleotide collection-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)中进行重叠序列的重复性检索,共搜索出33条相互重叠的EST序列与G04测序结果具有较高同源性,将33个序列利用SEQMAN软件进行“电

子”克隆。重叠区均达到100 bp以上, 拼接总长度为2 750 bp, 且序列中无间隔碱基。

2 RT-PCR电泳结果

根据拼接结果, 设计特异引物, 以菠萝果实混合总RNA为模板, 一步法RT-PCR。结果如图1所示, cDNA片段约为2 000 bp, 与“电子”克隆预测相吻合, 然后连接载体, 根据测序结果, 矫正错误核苷酸, 得到全长cDNA。

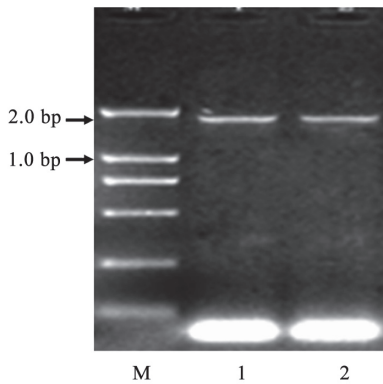


图1 RT-PCR电泳结果

Fig.1 The electrophoresis results of RT-PCR

M: DL2000 marker; 1、2: 重复扩增。

3 拼接结果及开放阅读框(ORF)预测

NCBI在线ORF Finder预测G04蛋白质序列, 得到该基因编码761个氨基酸, 氨基酸同源性比较, 最高仅为21% (菠萝浸染病菌后的一个未知功能基因), 由此确定该基因为未知新基因, 命名为*RFDI*。序列(图2)分析发现, 在起始密码子上游和终止密码子下游均具有全长基因的特点, 5'端起始密码子ATG上游非编码区的-35~-25含有TATA序列(TATA box), -80~-70区具有CCAAT序列(CAAT box), 而在-110~-80区含有GCCAGACCC或GGGCGGG序列(GC box), 3'端终止密码子TGA下游15~30 bp处有保守序列AATAAA、polyA合成酶结合序列CA-GU、结尾信号TATAAAAT和polyA尾巴。因此判定, 拼接所得基因为菠萝的全长基因。密码子偏爱性分析中发现该基因对A和T核苷酸较为喜好, 占序列中总核苷酸的64%。

4 *RFDI*基因蛋白质结构与功能预测

*RFDI*蛋白的相对分子量为89.71 kDa, 理论等电点pI 7.29, 不稳定系数是45.69, 预测为不稳定蛋

白。氨基酸组成中, 亮氨酸(9.6%)、丝氨酸(9.5%)、甘氨酸(7.7%)与脯氨酸(7.0%)含量最为丰富, 而色氨酸(1.1%)和半胱氨酸(1.6%)含量最少。

*RFDI*蛋白质二级结构预测结果表明该基因所编码的蛋白主要以 α 螺旋、不规则卷曲和延伸链为主要结构元件, 散布在整个蛋白质中, 无 β 折叠结构。蛋白质的疏水性分析显示, 多肽链氨基酸最低分值为-2.800, 最高为2.456, 同时脂肪族氨基酸指数为81.65, 总平均亲水性为-0.184, 可推测*RFDI*蛋白属于亲水性蛋白。

该蛋白质含有13个Cys, 共形成5个二硫键, 分别在第487位和第502位、第291位和第302位、第59位和第73位、第43位和第54位、第202位和第220位处的Cys形成二硫键。*RFDI*蛋白有31个Ser、11个Thr、8个Tyr可能成为蛋白激酶C磷酸化位点、酪蛋白激酶II磷酸化位点。软件预测35~36位点是最有可能的酶切位点, 故推断1~35个氨基酸为信号肽序列。亚细胞定位该蛋白有8%的可能性转运到叶绿体中, 3%的可能性存在于细胞核内, 1%的可能性存在于细胞质和线粒体中, 预测*RFDI*蛋白可能在协助物质运输或信号转导过程中起到重要的作用。

5 半定量PCR分析*RFDI*基因时空表达

半定量分析*RFDI*基因在菠萝果实不同发育时期的转录水平, 发现该基因在果实发育的整个时期均有表达(图3)。花后20 d果实中的*RFDI*表达量较低; 而30~50 d表达量几乎不变; 随着果实成熟, 表达量逐渐增加, 花后70 d达到最大值, 之后略有降低, 说明该基因的表达与果实成熟具有一定的相关性。

菠萝果实的发育过程受大量特异基因的调控(Itai等2000)。糖、酚类物质及有机酸等含量均发生了较大的变化(张秀梅等2006a, 2007b), 信号分子相互作用, 调节成熟相关基因选择性表达(Giovannoni 2001)。Moyle等(2005)发现在菠萝绿果期, 羟基酸氧化酶、过氧化物酶和谷胱甘肽转移酶含量较高, 同时, 果实蛋白酶及蛋白酶抑制剂随着果实成熟, 具有下降趋势。本文研究了*RFDI*基因在果实不同发育时期的表达模式, 推测该基因有可能参与果实代谢调控, 具体功能还有待进一步研究。

ATCAGGAACATGATAAGGCTCTGCGGATTGTATCTTCCGGCTCCGGGTTAATCTCCAACCCGGCTCTATAGTCTCGAC
 AGTTAGTCAATACGCCCTTGGTAGACGAACTCAGCGCCCAACT-
 TATAGT TCA ACA TTT TGT AAG CAG TTG GCC GAG GCA ATG AAT CGG TAT TGT GGC ACT TCT
 TTT TTT AGC ACT TGG AAG CCG GAT TCG TCC AGT GGT CCA AGT GGT ATC AAA ATA TCG GGC CTT
 AAA TCA ATT AAA GGG CCT GGA GTG CCT CGG CTG AAT CAG TCC AGA CGC CAC AAT TTT GAA
 K S I K G P G V P R L N Q S R R H N F E
 GCC GAG CAC GAT AGG GAC ATC AGG ATG GAA GGT TCA TCA GAC GAG CAC GCC TTC AAG CTC
 A E H D R D I R M E G S S D E H A F K L
 AAT GAA CGA GAA ACT TTA CCA GGC ATG CTG CAG GCT CTT GCT GAA GAT CAA ACT ATT GTT
 N E R E T L P G M L Q A L A E D Q T I V
 TCT GAG CAT TTT GAG ATT GAA AAG ATC GCC GGA AAC GGC CGG ATT CTC AAG ACC TTT AAT
 S E H F E I E K I A G N G R I L K T F N
 ATG TTC GAG GAC TGC TCT AAG AAG TCA TTG GGC AGA GCA GCA AAT TTG GTT TAC AAC TTC
 M F E D C S K K S L G R A A N L V Y N F
 TTC AGC TGC GCC TTC ATC AAG CCG ATT TTC AAA GTC GAG CTT ATC TTC GAA GTA CCC ATT
 F S C A F I K P I F K V E L I F E V P I
 GGG TAC ACA GTT CCT CTT CTA TGT TAC GAT CCA CTG CGA CAG GTA GAT GAT TCC ACC
 G Y T V P L L L C Y D P L R Q V D D S T
 CCC AAG TCA CTA CTC TTG AAT CTT GAG TCA ATC ATT GTR AAT CCG CGC GAT AGA GCT AAG
 P K S L L L N L E S I I V N P R D R A K
 TCG GAA ATC TTC CTT GTC TCT CCT CCT GGT CAC ACC GGA TGC TTT TCC CCT TGG CAA GAC
 S E I F L V S P P G H T G C F S P W Q D
 AGG CTC CAA TCC TGT GGA GCA TTT CAT GTG GCA TCC ATT GGC CAC ACC TTA CGC AAC ATG
 R L Q S C G A F H V A S I G H T L A N M
 GAA GGG AAG ATA CTG GCC GAA CTT CGC ATT GGA TTG GCA GCC GGC ACC ATT TTT GGC TCT
 E G K I L A E L R I G L A A G T I F G S
 GGC GAG TTG CCA CCT CCT CCT CTT CCA GAT GGG GAT TTC ATG TTT TTC CCC GGG CAC AGA
 G E L P P P P L P D G D F M F F P G H R
 GTG CAA TTT GAA TAC TTG AGG ACT CGA TAC TTG ATC TCC CAT ATC ACG GTG AAC AGC AAG
 V Q F E Y L R T R Y L I S H I T V N S K
 ACA CAG CCT GGG ACA ACT TAC AAA ACT TTG CTG CGT CCA GCC ATT GGT TAT GTC GAT
 T Q P G T T Y K T L L R P A I G Y V F D
 AAA GGG AGR AAG TCT TCA AAG AAC ACG AGC GCA GCT CTG TTT TCC CAC TAT AAC TTT TGG
 K G R K S S K N T S A A L F S H Y N F W
 AAC GCC ACT GTG GAG ATG GAA ATA CTA CTC TCG AGT AGG CGG GGA GTT GCA GGA ACA GCC
 N A T V E M E I L L S S R R G V A G T A
 ACT ATT TAC TTT GTG CCT AGT GGC ATT CGA TTG GAA ACT ACA TCT CCC AGT TGG TTG GCT
 T I Y F V P S G I R L E T T S P S W L A
 CAA TTT CCA AAT CAA ACA TTT ACG TTC TCT GGG CCA ACC AAA CTG AAT ATA CAC TTT GAT
 Q F P N Q T F T F S G P T K L N I H F D
 AAT TAC GCC TGG TTG GGA GGG AGT CTG TGC CAT GGC GAG AAC AAT TTG CAG CTG GGT TTC
 N Y A W L G G S L C H G E N N L Q L G F
 CCT ACT CCC ATT TGC CCA ACR ATA ATC ACC ATC CTT CAA AGC CGG CCT TCT GCA GCT CAG
 P T P I C P T I I T I L Q S P P S A A Q
 GGC AGT TCT TCA GAG GTC CAT CTT TTC TAT AGA GTG ACT GGC TTT CGA AAT CTT GAA CTT
 G S S S E V H L F Y R V T G F R N L E L
 TAT GAG AGG GCC TCT CTG TCT TAC ATC AAA GCT CCA TCC CTG GCA GCR CCA GAT CCT AAT
 Y E R A S L S Y I K A P S L A A P D P N
 TTG AAT GCA GGG TGG GCG GCT CTT GTG AAG AAC GGA CAA TCC AAG GAG CCA CTT GCC CAG
 L N A G W A A L V K N G Q S K E P L A Q
 GGG TCT GCG TGT GCC ACA GCA GGT TTT TCT AAC GGC AGT AGG ATT TTA ACA GTG GTG CCA
 G S A C A T A G F S N G S R I L T V V P
 CAC GAT GGG GAG TTG GAC AAT ATT CTG RTT ATG CCA GCC TCC CCA GCA ATT CTC GAC AGC
 H D G E L D N I L X M P A S P A I L D S
 AAC TTT AAT CCG GAA TCG CGC AAT ATG GTG CAA ATG AAG CTA ACA CCA GGC TCA ATT TTT
 N F N P E S R N M V Q M K L T P G S I F
 CGA GAT CAA GCT TCC TTG CTA GCG GTA CTC ATT TCT AGC ACC CCA TAC TTT CGC GGT AGA
 R D Q A S L L A V L I S S T P Y F R G R
 ATG CGT TTC TGG TTC ATT CCA ACT TAT ATT GGG GAT GAG TAC CGT ACT CTG GAT GTT GCC
 M R F W F I P T Y I G D E Y R T L D V C
 TAT CTG AAC AAT CCT CTG GAA GAC TAT TCA TTT GGT CTT ACC AAA ATG GAC AGC AGC TTC
 Y L N N P L E D Y S F G L T K M D S S F
 CAG AGA ACT ATG TAC GGG GGT CTG GTC GTC GGA CAT AGT ACA CGC GGA GAA CCA ATT GCT
 Q R T M Y G G L V V G H S T R G E P I A
 CTG GAT GTC CCT GCT AGA CAC ATC TTT TCA CGA TCC AGG ATT CGC CAC AAG GAC AAC ATC
 L D V P A R H I F S R S R I R H K D N I
 AAC GCT TTC TTG GAT TCT AAT GGT TTG TTT GTG GTA AGG ATG CCA TCT TTC GCC CRT TTA
 N A F L D S N G L F V V R M P S F A R L
 CAA CGG TTG GAC GTA TTT TGC GAG TTG CTG GAA CCT ATT CAC CTA TGG GGT CTT GCC ATA
 Q R L D V F C E L L E P I H L W G L A I
 GGC CGC GAA GAT GTG GTC GAC GCT AAA AGT CAG TAT GTG CCT GCR ACG ATT ATT TTG CCC
 G R E D V V D A K S Q Y V P A T I I L P
 ACT GAC TCA GGA GGA TTT AAC GAA TTT TAT TCG CCT CCT TGA CGA GCG ATT CTG AGA GCC
 T D S G G F N E F Y S P P *
 TTAATAAGTATGCGCGCTACACAGTGTCTGTCACACGACACGCGGCACATGCTTTTATTTATTTGTTCTGTATAGTTCGT
 TCAGTGTGTTAGGTATAGAGATTTTTGTCGGTTTGTATCTCTGAGAAAACCGTCTGGCCAGTTGGTTGGCCACCTAGGGT
 GTAGGACCTGGGTTAAACCAACACTATAAAATCGTTCACTTGTGTCTTTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图2 菠萝*RFD1*基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *RFD1* gene from pineapple fruit

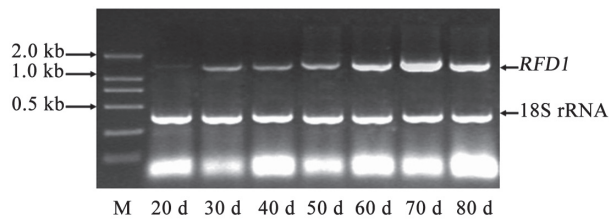


图3 *RFD1*基因在菠萝果实发育不同时期的表达

Fig.3 Expressions of *RFD1* gene during different development of pineapple fruit

M: DL2000 marker.

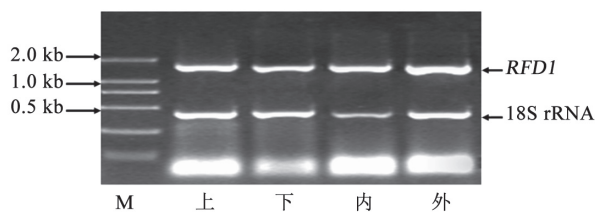


图4 *RFD1*基因在菠萝果实发育不同部位的表达

Fig.4 Expressions of *RFD1* gene in different parts of pineapple fruit

上、下、内、外: 菠萝果实的不同部位; M: DL2000 marker.

选择第70天*RFD1*基因活性最强时期, 研究果实4个不同部位的表达。*RFD1*在果实的不同部位均有较强表达量, 仅在果实的外部略高。推测其表达量有可能受到果实内部成分, 特别是糖分和有机酸的影响。张秀梅等(2006, 2007)研究菠萝果实含糖量及其代谢酶活性变化发现, 随着果实的发育, 蔗糖磷酸成酶、蔗糖合成酶和柠檬酸含量的动态变化类似于*RFD1*基因表达。而果实成熟时, 由于代谢酶的变化, 可能抑制了*RFD1*基因的表达。

参考文献

- 王尉, 梁国鲁, 谢江辉(2007). 香蕉不同组织中总RNA提取方法的研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 32: 62~67
- 张秀梅, 杜丽清, 谢江辉, 陈佳瑛, 弓德强, 李伟才(2006). 蔗糖代谢相关酶在卡因菠萝果实糖积累中的作用. 果树学报, 23 (5): 707~710
- 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 弓德强, 陈佳瑛, 李伟才, 谢江辉(2007). 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化. 果

树学报, 24 (3): 381~384

- Aharoni A, Keizer LC, Van Den Broeck HC, Blanco-Portales R, Munoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RC, O'Connell AP (2002). Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol*, 129: 1019~1031
- Botella JR, Smith M (2008). Genomics of pineapple, crowning the king of tropical fruits. *Genomics Tropic Crop Plants*, 441~452
- Davies C, Robinson SP (2000). Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology*, 122: 803~812
- Giovannoni J (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 52: 725~749
- Giovannoni JJ (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16: 170~180
- Hadfield KA, Dang T, Guis M, Pech JC, Bouzayen M, Bennett AB (2000). Characterization of ripening-regulated cDNAs and their expression in ethylene-suppressed charentais melon fruit. *Plant Physiol*, 122: 977~983
- Itai A, Tanabe K, Tamura F, Tanaka T (2000). Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *J Exp Bot*, 51: 1163~1166
- Levi A, Davis A, Hernandez A, Wechter P, Thimmapuram J, Trebitsh T, Tadmor Y, Katzir N, Portnoy V, King S (2006). Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit. *Plant Cell Rep*, 25: 1233~1245
- Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T, Omura M (1998). Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene*, 211: 221~227
- Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M, Botella JR (2005a). Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J Exp Bot*, 56: 101~112
- Moyle RL, Crowe ML, Ripi-Koia J, Fairbairn DJ, Botella JR (2005b). Pineapple DB: an online pineapple bioinformatics resource. *BMC Plant Biol*, 5: 21
- Neuteboom LW, Kunimitsu WY, Webb D, Christopher DA (2002). Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Sci*, 163: 1021~1035
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296: 343~346