

砀山酥梨果实F5H表达与石细胞发育的分析

徐超¹, 方志¹, 杨芳梅¹, 杨君祎¹, 闫冲冲¹, 邹鹤伟¹, 张金云², 林毅¹, 蔡永萍^{1,*}

¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥230036; ²安徽省农业科学院园艺研究所, 合肥230031

摘要: 薄壁细胞次生壁木质化是石细胞形成的关键, 石细胞团聚合主要受木质素单体组分及官能团含量的影响。阿魏酸5-羟化酶(F5H)是木质素合成途径中的一种关键酶, 主要调控紫丁香基木质素(S木质素)单体的生物合成。本研究以砀山酥梨果实为材料, 利用RT-PCR和RACE技术, 得到砀山酥梨F5H全长cDNA, 命名为*PbF5H* (GenBank登录号为KC852907)。*PbF5H*全长1 978 bp, 其开放阅读框为1 551 bp, 编码516个氨基酸, 推测蛋白分子量是58.4 kDa, 等电点为6.49。进化树分析表明, 砀山酥梨F5H蛋白与其他物种具有很高同源性, 与苹果的相似性达到96%。相关性分析表明, 砀山酥梨木质素含量与石细胞含量和*PbF5H*表达量高度正相关。且砀山酥梨*PbF5H*参与调控梨果实S木质素单体的合成, 影响木质素G/S比值。

关键词: 砀山酥梨; *PbF5H*; 生物信息学分析; 荧光定量表达; G/S比值

Analysis of F5H Expression and Stone Cell Development in *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su Fruit

XU Chao¹, FANG Zhi¹, YANG Fang-Mei¹, YANG Jun-Yi¹, YAN Chong-Chong¹, ZOU He-Wei¹, ZHANG Jin-Yun², LIN Yi¹, CAI Yong-Ping^{1,*}

¹School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ²Horticultural Institute, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230031, China

Abstract: The development of pear stone cells is closely related to the deposition of lignin on secondary cell walls, and the degree of stone cell polymerization is mainly determined by the lignin monomer composition and the content of functional groups. Ferulate 5-hydroxylase (F5H) is a key enzyme in lignin biosynthesis pathway that mainly regulates syringyl lignin. In this study, we cloned a F5H gene, named *PbF5H* (GenBank Accession No. KC852907) in *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su fruit by RT-PCR and RACE methods. The *PbF5H* cDNA comprises 1 978 bp, with an ORF of 1 551 bp, which encodes a putative protein containing 516 amino acid residues. The protein molecular weight is 58.4 kDa and the isoelectric point is 6.49. Phylogenetic analysis indicated that *PbF5H* protein shared high homology with other plant F5Hs, and showed 96% homology with *Malus domestica*. Correlation analysis showed that, lignin content had a highly positive correlation to stone cell content and *PbF5H* expression level. *PbF5H* as the key gene of syringyl lignin biosynthesis contributed to the G/S ratio.

Key words: *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su; *PbF5H*; bioinformatics analysis; real-time quantitative expression; G/S ratio

砀山酥梨(*Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su)属白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd)系品种, 是我国种植面积最广, 产量最大的梨品种, 经济价值突出。但由于品种退化、田间粗放管理等原因, 梨果实石细胞含量增多, 口感多渣, 严重影响了果实的品质和经济价值(聂敬全等2009)。

梨果实石细胞的品质是由石细胞团的聚合度和密度二者综合决定的, 石细胞团的聚合度更能影响梨果实品质与口感(陈昭存等2000)。砀山酥梨石细胞发育过程中, 薄壁细胞次生壁木质化是引起石细胞形成的关键(李玲等2004), 石细胞聚合

度主要受木质素单体组成及官能团含量的影响(Yan等2014), 石细胞含量和木质素含量呈显著正相关, 石细胞木质素由G和S单体组成, 且G木质素含量高于S木质素(Cai等2012)。其中G木质素更易形成比较稳定、不易降解的C=C。所以, 当G/S比值越高, 其形成的聚合体木质素越难以降解(Jin等2013)。

收稿 2015-03-19 修定 2015-04-24

资助 国家自然科学基金(31171944和30771483)、国家大学生创新训练项目(201310364005)和安徽省大学生创新训练项目(AH201310364044)。

* 通讯作者(E-mail: ypciaiah@163.com; Tel: 0551-65786137)。

迄今, 木质素合成代谢途径已基本阐明(Van-holme等2010; Oda和Fukuda 2012; 闫丽等2013), 阿魏酸5-羟化酶(F5H)在木质素合成途径中催化阿魏酸、松柏醇、松柏醛生成5-羟基阿魏酸、5-羟基松柏醇和5-羟基松柏醛(Osakabe等1999)。F5H对S木质素合成起限速的作用, 过量表达导致S木质素含量增加, 总木质素含量不变(Franke等2000)。在转基因拟南芥中, 用C4H启动子调控F5H过表达, S木质素含量高达95% (Weng等2010)。而转基因杨树中, 在木质素总量及植物表型不变的情况下, S木质素显著增加, 细胞强度降低(Huntley等2003)。因此, 对砀山酥梨PbF5H的调控可能是改良梨果实木质素G和S单体比例, 从而影响梨石细胞含量和石细胞团聚合度, 改善梨果实品质的有效手段。但到目前为止, 砀山酥梨PbF5H表达如何调节梨木质素单体变化和石细胞团聚合度的研究未见报道。

梨是自交不亲和的植物, 花粉直感现象明显(陈昭存等2000), 自花授粉不结实, 异花授粉可能在很大程度上影响果实品质。本实验以砀山酥梨果实为材料, 克隆PbF5H的cDNA全长。以座果率高、品质差异显著的2个品系(砂梨系圆黄, 白梨系鸭梨)为父本对砀山酥梨异花授粉(张金云等2010), 研究该基因在砀山酥梨异花授粉的果实中表达模式, 分析PbF5H表达与梨果实石细胞含量、木质素含量、木质素单体G/S比值的关系, 为进一步研究砀山酥梨PbF5H功能及调控模式奠定基础。

材料与方 法

1 材料

实验材料为砀山酥梨(*Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su)果实, 采自安徽省砀山果园场。结合实验室前人的研究(张金云等2010), 以座果率高、品质差异显著的2个品系(砂梨系圆黄, 白梨系鸭梨)为父本对砀山酥梨异花授粉, 分别于花后23、39、47、63、79和145 d取样, 果实保存于-80 °C备用。

2 方法

2.1 砀山酥梨总RNA提取及反转录

采用天根公司 RNA prep Pure Plant Kit试剂盒提取砀山酥梨果实的总RNA。总RNA反转录采用TaKaRa公司的PrimScript™ first strand cDNA synthesis kit试剂盒。合成的cDNA于-20 °C保存备用。

2.2 PbF5H全长cDNA克隆

根据GenBank上其他植物的F5H蛋白保守区段序列设计简并引物PbF5H-F和PbF5H-R (表1)。反应条件为: 94 °C预变性 5 min; 94 °C变性45 s, 56 °C退火 45 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 最后72 °C延伸10 min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带, 连接 pMD18-T载体, 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 将PCR验证的阳性克隆送上海生工测序。

根据测序结果, 设计3' RACE和5' RACE反应所需的引物: 3' RACE outer primer, 3' RACE inner primer, 5' RACE outer primer, 5' RACE inner primer (表1)。本实验中所用到的全部引物如表1所示。3'

表1 本研究中使用的主要引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')
PbF5H-F	CAN TAYGAYMGNCGNGAYAT
PbF5H-R	CCNCCRAACATNACRTCCAT
3' RACE outer primer	ACAATAGACTCGCTAAGGCTCG
3' RACE inner primer	TCGGCTGTAAACATCGGAGAGT
5' RACE outer primer	AACGACTCACGAGCCTTAGCGA
5' RACE inner primer	CTCTCCGATGTTTACAGCCGAA
cdsF	CATGCCATGGATTCTTCTTCTGC (划线显示NcoI识别序列)
cdsR	CCCAAGCTTTCATCACCATCAGAGTGG (划线显示HindIII识别序列)
Tubulin-F	AGAACAAGAACTCGTCTCTAC
Tubulin-R	GAAGTCTCGCTCACTCTCC
QF5H-F	TAGGATCCATGGGTTCGACCCAGAG
QF5H-R	GCAAGCTTGCAGAGGGAGCATGCCA

RACE和5' RACE (Smart Race Kit, Clontch. Polo Alto)方法步骤参照试剂盒说明书。PCR扩增并胶回收目的条带,连接 pMD18-T载体,转化感受态 *E. coli* DH5 α ,将PCR验证的阳性克隆送上海生工测序,根据测序结果拼接获得*PbF5H*的全长。

根据*PbF5H*的ORF,设计带有酶切位点的引物*cdsF*和*cdsR*(表1)。PCR扩增并胶回收目的条带,连接 pMD18-T载体,转化感受态 *E. coli* DH5 α ,将PCR验证的阳性克隆送上海生工测序。

2.3 *PbF5H*核苷酸序列和生物信息学分析

利用各种在线网站的生物信息学软件对*PbF5H*核苷酸序列进行分析:利用在线网站(<http://isoelectric.ovh.org/>)预测矜山酥梨*PbF5H*蛋白的理论分子量与等电点等;利用DNAMAN软件进行序列分析和进化树绘制;利用TMHMM2.0 Server v.2对矜山酥梨*PbF5H*蛋白的跨膜结构域进行预测(崔晓燕等2013);利用PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>)在线分析工具预测蛋白的二级结构等。

2.4 *PbF5H*实时荧光定量表达分析

根据获得的*PbF5H*全长序列设计荧光定量PCR特异性引物QF5H-F和QF5H-R,选取 β -*Tubulin*(登录号为AB239680.1)作为内参基因(Imai等2014),设计内参引物*Tubulin-F*和*Tubulin-R*(表1)。使用ABI7500荧光定量PCR仪反应,以梨果实的cDNA为样本,每个样本做三个重复,按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。反应体系:SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 \times) 10 μ L,模板cDNA 1 μ L,上下游引物各0.5 μ L,加水补充至20 μ L体系。PCR反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,40个循环。

2.5 石细胞含量测定

参照Cai等(2012)方法测定:采用四分法称取梨果肉5.0 g左右,于-20 $^{\circ}$ C冰箱中处理24 h,匀浆3 min,转速为20 000 r \cdot min⁻¹,向烧杯中加水并静置数分钟。然后将烧杯上层的碎果肉倒出,再加水重复此步骤,直至上层液体澄清。过滤,烘干得到石细胞。3次称重,取平均值,计算石细胞含量[石细胞含量(%)=石细胞干重(g)/5 g \times 100]。

2.6 木质素含量测定

参照Cai等(2012)方法测定:梨果实去核去皮后果肉烘干,研磨成粉末,过筛,甲醇抽提后烘干,取0.2 g干粉样品,15 mL 72% H₂SO₄ 30 $^{\circ}$ C抽提1 h,

加115 mL蒸馏水煮沸1 h,保持总体积不变;将反应后混合液过滤,用500 mL热水冲洗,得到的木质素烘干后称重,重复3次,计算木质素含量[木质素含量(%)=木质素干重(g)/0.2 g \times 100]。

2.7 木质素单体测定

参照Cai等(2012)的方法,提取矜山酥梨果实石细胞磨木木质素。然后参照Kevin等(2006)方法:将50 mg磨木木质素样品溶于1 mL吡啶/乙酸酐(1:1)混合溶剂中,氮气保护,常温黑暗处放置72 h,加入乙醚,6 000 r \cdot min⁻¹离心分离沉淀。乙醚反复洗涤沉淀,即得到乙酰化的木质素。乙酰化木质素样品溶于0.5 mL CdCl₃中,以TMS为内标,用Bruker DMX300NB型超导核磁共振波谱仪,在500 mHz条件下测定。根据木质素¹H-NMR的谱图,对不同授粉品种梨木质素的GS单体相对应的特征峰进行范围区分和积分,以内标作为对照,即可得到GS单体的相对含量(Yan等2014; Jin等2013)。

实验结果

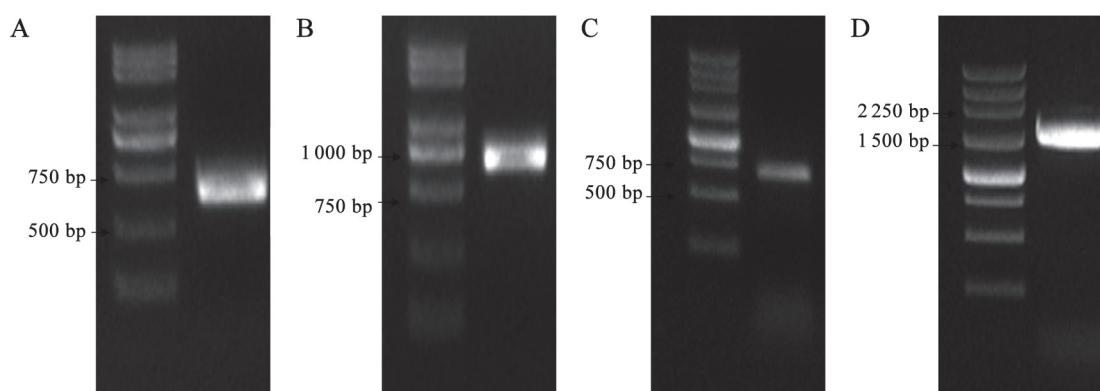
1 矜山酥梨*PbF5H*全长cDNA克隆及生物信息学分析

利用引物*PbF5H-F*和*PbF5H-R*扩增得到1条600 bp左右的条带(图1-A)。采用3' RACE的方法经两轮扩增得到1条约1 000 bp的条带(图1-B);采用5' RACE的方法扩增*PbF5H*的5'端,得到一条约600 bp的DNA片段(图1-C),利用引物*cdsF*和*cdsR*扩增获得1条约1 500 bp的条带(图1-D)。

拼接获得*PbF5H*的全长为1 978bp,最大开放阅读框为1 548 bp,共编码516个氨基酸,在GenBank的登录号为KC852907(图2),图中边框部分代表亚铁血红素结合结构域。

用在线网站(<http://isoelectric.ovh.org/>)预测*PbF5H*蛋白的理论分子量约为58.4 kDa,理论等电点为6.49。利用PredictProtein在线分析工具(<http://www.predictprotein.org/>)预测*PbF5H*蛋白二级结构,发现 α 螺旋占48.84%, β 折叠5.62%,无规则卷曲占45.54%。

用TMHMM2.0 Server v.2对*PbF5H*蛋白的跨膜结构域进行预测。软件预测结果显示,整条肽链有一个跨膜结构域,多肽链1~12位于膜内,13~31横跨质膜,32~516位于膜外,推测该基因可能在质膜上发挥功能,这与拟南芥和杨树的F5H蛋

图1 *PbF5H*克隆的PCR电泳图Fig.1 The electrophoresis results of *PbF5H* fragmentsA: *PbF5H*特异性片段扩增; B: 3' RACE扩增; C: 5' RACE扩增; D: CDS扩增。

白预测是一致的(李嘉和孟庆熊2006)。

利用NCBI BLAST检索*PbF5H*与其他植物的氨基酸同源性,并用DNAMAN软件绘制系统进化树(图3)。多重比对发现发现蔷薇科植物砀山酥梨、苹果、梅和草莓明显聚为一类,其中砀山酥梨氨基酸序列与苹果的同源性最高,相似性达到96%,与其他植物的序列相似性也都高于75%,说明*PbF5H*蛋白在不同物种中是较为保守的。

2 不同品种授粉对砀山酥梨果肉中*PbF5H*表达量的影响

为了进一步探讨*PbF5H*的功能,测定了砂梨系圆黄,白梨系鸭梨为父本对砀山酥梨异花授粉后,*PbF5H*在梨果实中表达量。

由图4可知,圆黄(♂)×砀山酥梨(♀)的梨果实*PbF5H*表达量显著高于鸭梨(♂)×砀山酥梨(♀)的梨果实,但梨果实不同发育阶段*PbF5H*的表达量变化趋势基本一致,呈现表达量先上升后下降的趋势。圆黄(♂)×砀山酥梨(♀)和鸭梨(♂)×砀山酥梨(♀)的梨果实*PbF5H*表达量都于花后47 d达到高峰,花后145 d(成熟期)基本检测不到*PbF5H*的表达量,这可能是由于在果实成熟之前,石细胞团已成型,在果实成熟过程中,主要进行营养成分如碳水化合物等的积累,石细胞团可能不再继续发育,相对果实干物质总量,木质素相对含量下降(聂敬全等2009)。

3 不同品种授粉对砀山酥梨果实石细胞和木质素含量的影响

为了进一步探讨*PbF5H*表达量与石细胞含量

和木质素含量的关系,测定了砂梨系圆黄,白梨系鸭梨为父本对砀山酥梨异花授粉后,梨果实中石细胞含量和木质素含量,并进行相关性分析。

由图5可知,异花授粉的砀山酥梨在不同发育时期的变化趋势基本一致,都呈现先上升再下降趋势,石细胞和木质素含量都在花后63 d时达到高峰。79 d以后,石细胞发育基本停止,果实持续膨大发育,导致石细胞与木质素的相对含量下降(聂敬全等2009)。相关性分析表明,圆黄(♂)×砀山酥梨(♀)的木质素与石细胞含量相关系数 $r=0.70$,鸭梨(♂)×砀山酥梨(♀)的相关系数 $r=0.78$ 。*PbF5H*相对表达量与木质素含量的相关系数 r 分别为 -0.12 (圆黄♂×砀山酥梨♀)和 0.14 (鸭梨♂×砀山酥梨♀)。但是,*PbF5H*相对表达量与木质素含量进行错位比较(即把*PbF5H*相对表达量的趋势图向后平移一个时期),则相关系数 r 分别为 0.88 (圆黄♂×砀山酥梨♀)和 0.61 (鸭梨♂×砀山酥梨♀)。这说明异花授粉砀山酥梨果实不同发育时期的木质素含量与石细胞含量和*PbF5H*的相对表达量高度正相关,且木质素含量的变化趋势滞后于*PbF5H*的相对表达量变化趋势。

4 不同品种授粉对砀山酥梨果实木质素单体含量的影响

为了进一步探讨*PbF5H*表达量与S木质素单体关系,测定了砂梨系圆黄、白梨系鸭梨为父本对砀山酥梨异花授粉后,幼果(47 d)和成熟梨果实(145 d)中木质素单体含量,并进行分析。

表2可知,不同授粉品种,砀山酥梨果实木质

```

1  ggaaaaatagcaacattttgagttgcccatacaacttctactagccataccactgaaagaagtaaaaa
70  aaaaaaaaaaagaataagagaacacacacaatATGGATTCTCTTCTGCAATCCTTGCAACCCCTTAA
1  M D S L L Q S L Q P L K
139 ATCCATGACACCACCTGTTTATAATCCACTCTTCTCTCCCTAATTTTCGGTTCCGGGG
13  S M T P L V F I I P L L F L L P L I F R F R R
208 ACTACCACCGTACCCCGCCGCAAGGCTACCCCTCATTGGCAACATGTTAATGATGGACCACT
36  L P P Y P P G P K G L P L I G N M L M M D Q L
277 AACCCACCGGGGCTCGCAAGCTGGCAAGCAATACGGCGGCATATTCACCTCCGATGGGGTTTTT
59  T H R G L A K L A K Q Y G G I F H L R M G F L
346 ACACATGGTGGCGTTTCCAAACCGGAGCTGGCAGACAGCTCCCAAGTCCAAGACAACTTCTCT
82  H M V A V S N P D V A R Q V L Q V Q D N I F S
415 CAACCGCCCGCCACCATCGCATCAGCTACCTCAGCTACCGCGGCTGACATGGCTTCGGTACTA
105 N R P A T I A I S Y L T Y D R A D M A F A Y Y
484 CGGGCCCTTCTGGCGCAGATGCGTAAGCTTGGCTCATGAAGCTCTTAGTCGCAACCGCTGATGC
128 G P F W R Q M R K L C V M K L F S R K R A E S
553 GTGGGAGTCTGTTAGGACGAGTGGACTCGGGCGTTAGGACCGTACAGTTTCAAGTTGGTGGCTGT
151 W E S V R D E V D S A V R T V T V H V G S A V
622 AAACATCGGAGAGTTAGTTTTTTCGCTCAGAAAAATATTTATTTATCGGGCGGCTTCGGTACGAGCTC
174 N I G E L V F S L T K N I I Y R A A F G T S S
691 GCAGGAGGGGAGGATGAGTTTATTGCGTACTGCGAGAACTTCCCAAGTTGTTGGAGCTTTAATAT
197 Q E G Q D E F I A I L Q E F S K L F G A F N I
760 TGCTGATTTTTATCCACGCTAGGTTGGTGTGCTCCTCAGGGGTAACAATAGACTCGCTAAGGCTCG
220 A D F I P S L G W V D P Q G L N N R L A K A R
829 TGAGTCTTTGGATCGGTTTATGACACCATCATAGACGATCAGTGGAGAAGAAGAACAATAAGGG
243 E S L D R F I D T I I D D H M E K K K N N K G
898 ATTGAATGATGGTGGAGCGGATGGTGGATGAGTTGGCTTTTTACAGTGAAGAAGCTAAAGTAA
266 L N D G E T D M V D E L L A F Y S E E A K V N
967 TGAATCTGAAGAATAATTTGCAAGCGCATAAACTACTAGGGATAACATCAAGGCCATCATCGGA
289 E S E D N L Q S A I K L T R D N I K A I I M D
1036 CGTAATGTTGGCGGACGGAGACTGTGGCTCGCAATAGAGTGGCCATGTCGGAGCTGATGAAGAG
312 V M F G G T E T V A S A I E W A M S E L M K S
1105 CCCGAGGACCTAAAGAGGTCACAAGAAGTCTGCTGACGTGGTGGTCTAGACCGTCGACCTGAAGA
335 P E D L K R V Q Q E L A D V V G L D R R P E E
1174 GACCGACTCGAAGTTGACATACCTAAAATGTCCTAAAAGAGACTACGACTCGGCCACCAAT
358 T D F E K L T Y L K C A L K E T L R L R P P I
1243 TCCACTACTCCTCCAGAGACTCGGAGGCGCTGAGTAGCCGCTACCGCATTCCCAAAAGATCGGG
381 P L L L H E T S E D A V V A G Y R I P K R S R
1312 TGATGATCAACCGTGGCCATTTGACGCTGACAAGGACTCGTGGGAGGACCGGAGTCTTCAAGCC
404 V M I N A W A I G R D K D S W E D A E S F K P
1381 CTCGAGTTTTTGAAGAAGTGTGCTGACTTAAAGGGGAGTAACTTCGAGTTCATTCCGTTCCGGTC
427 S R F L K E G V P D F K G S N F E F I P F G S
1450 CGGTGGAGTCTGTCGCCGCTGCAACTAGGTTGTACGCGTGGAGATGGCGGTGGCACACTTGGT
450 G R R S C P G M Q L G L Y A L E M A V A H L L
1519 TCATTGTTTACGTTGGAGTTCCTGATGATGAAACCTAGTGGCTGGACATGAACGACGCTTTGG
473 H C F T W E L P D G M K P S E L D M N D V F G
1588 ACTCACCGCTCCGAGACGACTGACTCATCGCGTACCGAGTAAAGGGTGGTTGTCACCTGATg
496 L T A P R A S R L I A V P S K R V V C P L *
1657 gtgatgaaaaaacagcttgcacgagagagataaacagtggtgcaatttggtagtgaatgatac
1726 tgtgaaactgcacagtaaatgcaagcgttttttttattgttcttttgaanaactaataatacaaa
1795 gagaccatgaacagttgtcggaatttttagttctctctttgtgtatatacaactcttttggttt
1864 gtttaattgtatgcaatttatctttaaatttctctcttttttctttttgttttggttattat
1933 tgtattgaaataaaaataatagcttaagttacaaaaaa

```

图2 PbF5H核苷酸序列及其推导的氨基酸序列
Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of PbF5H gene

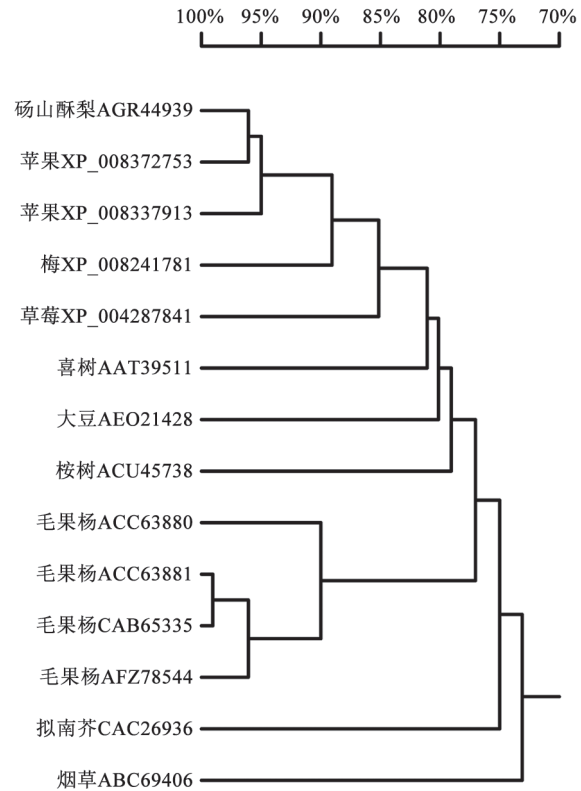


图3 PbF5H蛋白与其他植物F5H的氨基酸序列关系分析
Fig.3 Phylogenetic relationship of amino acid sequences between PbF5H and other F5H proteins

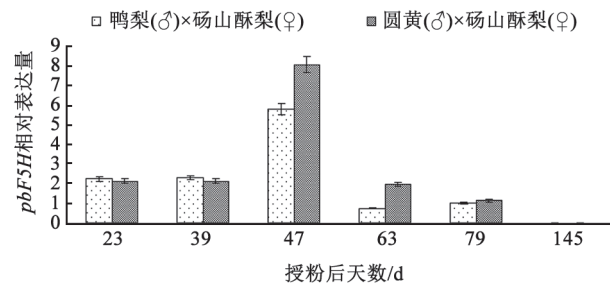


图4 不同品种授粉的砵山酥梨果实PbF5H表达量
Fig.4 Relative expression of PbF5H in different cultivars pollinated *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su

素G/S单体比值发生改变, 而幼果和成熟期的圆黄(♂)×砵山酥梨(♀)果实的S木质素单体含量均高于鸭梨(♂)×砵山酥梨(♀), 这可能是由于PbF5H在圆黄(♂)×砵山酥梨(♀)中表达量高导致的。而G木质素单体含量和G/S比值与PbF5H的相对表达量没有明显对应关系, 这表明PbF5H可能是特异性地参与S木质素单体的合成。

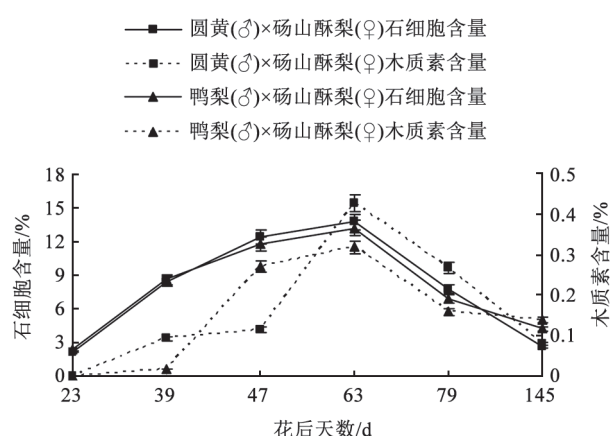


图5 不同品种授粉的砀山酥梨果实石细胞和木质素含量
Fig.5 Content of stone cells and lignins in different pollination varieties of *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su

表2 不同品种授粉的砀山酥梨果实木质素单体含量

Table 2 Content of lignins in different pollination varieties of *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su

授粉品种	S木质素相对含量	G木质素相对含量	G/S
圆黄(♂)×砀山酥梨(♀) (47 d)	4.67	5.12	1.10
鸭梨(♂)×砀山酥梨(♀) (47 d)	3.20	0.97	0.30
圆黄(♂)×砀山酥梨(♀) (145 d)	4.52	2.26	0.50
鸭梨(♂)×砀山酥梨(♀) (145 d)	2.49	3.17	1.27

讨 论

梨是典型自交不亲和的植物,花粉直感现象明显(陈昭存等2000),异花授粉导致砀山酥梨*PbF5H*表达量、梨石细胞含量、木质素含量及木质素GS单体含量都发生改变。但在果实不同发育时期,异花授粉导致的变化趋势是一致的,都呈现先上升后下降趋势。

相关性分析表明,异花授粉的砀山酥梨木质素含量与*PbF5H*相对表达量和石细胞含量高度正相关,且木质素含量的变化趋势滞后于*PbF5H*的相对表达量变化趋势。这表明,砀山酥梨果实的细胞木质化是影响石细胞形成的关键因素(李玲等2004),而*PbF5H*作为调控S木质素合成的关键基因,主要参与调控S木质素单体,影响G/S比值,其表达量与木质素总量的关系仍需进一步研究。

总之,木质素合成是一个复杂的代谢网络,涉及到多个基因的调控(Vanholme等2010)。此外,已

知的木本植物如毛果杨、蓝桉(García等2014)等也存在*F5H*家族基因。而砀山酥梨作为木本植物,是否存在其他*F5H*则需要进一步的研究。本研究中,*PbF5H*的生物信息学分析及相关性分析表明,该基因可能参与S木质素生物合成。*PbF5H*是调控砀山酥梨果实S木质素的合成的关键基因之一,影响木质素单体G/S比值,进而可能影响石细胞团的聚合度。今后可尝试构建*PbF5H*的真核表达载体,进行遗传转化,培育石细胞团聚度低、口感优良的梨品种。

参考文献

- 陈昭存, 陈艳玲, 葛敏, 杨鹏远(2000). 砀山酥梨优良授粉品种的授粉试验. 西南园艺, 28 (4): 8~9
- 崔晓燕, 李长江, 孙帆, 张世宏, 张凌云(2013). 青杆*PwUSP1*基因的克隆及表达模式分析. 50 (4): 407~414
- 李玲, 蔡永萍, 刘小阳(2004). 梨果实的石细胞. 植物生理学通讯, 40 (5): 629
- 李嘉, 孟庆雄(2006). 植物阿魏酸5-羟化酶生物信息学分析. 生物技术通报, 6: 195~201
- 聂敬全, 蔡永萍, 张士鸿, 林毅, 徐义流, 张金云(2009). 砀山酥梨果实石细胞与薄壁细胞发育关系的解剖学研究. 园艺学报, 36 (8): 1209~1214
- 闫丽, 夏光敏, 黄应华, 赵双宜(2013). 高粱肉桂酸羟化酶基因*SbC4H1*降低拟南芥的木质素合成. 植物生理学报, 49 (12): 1433~1441
- 张金云, 雷波, 高正辉, 伊兴凯, 潘海发, 蔡永萍(2010). 安徽省砀山酥梨适宜授粉树筛选探讨. 中国农学通报, 26 (18): 224~230
- Cai YP, Li GQ, Nie JQ, Lin Y, Nie F, Zhang JY, Xu YL (2012). Study of the structure and biosynthetic pathway of lignin in stone cells of pear. *Sci Horticulture-Amsterdam*, 125 (3): 374~379
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Chapple C (2000). Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J*, 22 (3): 223~234
- García JR, Anderson N, Le-Feuvre R, Iturra C, Elissetche J, Chapple C, Valenzuela S (2014). Rescue of syringyl lignin and sinapate ester biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by a conifer aldehyde 5-hydroxylase from *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell Rep*, 33 (8): 1263~1274
- Huntley SK, Ellis D, Gilbert M, Chapple C, Mansfield SD (2003). Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-Transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *J Agr Food Chem*, 51: 6178~6183
- Imai T, Ubi B, Saito T, Moriguchi T (2014). Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. *PLoS ONE*, 9 (1): e86492
- Jin Q, Yan CC, Qiu JX, Zhang N, Lin Y, Cai YP (2013). Structural characterization and deposition of stone cell lignin in Dangshan Su pear. *Sci Horticulture-Amsterdam*, 155: 123~130
- Kevin MH, Chang HM, Hasan J, John KF (2006). Quantitative

- ¹³C-NMR characterization of milled wood lignins isolated by different milling techniques. *J Wood Chem Technol*, 26: 21~34
- Oda Y, Fukuda H (2012). Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Curr Opin Plant Biol*, 15: 38~44
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chiang VL (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8955~8960
- Tao ST, Khanizadeh S, Zhang H, Zhang SL (2009). Anatomy, ultrastructure and lignin distribution of stone cells in two *Pyrus* species. *Plant Sci*, 176: 413~419
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, 153: 895~90
- Weng JK, Mo H, Chapple C (2010). Over-expression of *F5H* in *COMT*-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation. *Plant J*, 64 (6): 898~911
- Yan CC, Mei Y, Zhang N, Jin Q, Fang Z, Cai YP (2014). Stone cell distribution and lignin structure in various pear varieties. *Sci Hortic-Amsterdam*, 174: 142~150