

# 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因在荏梨果实发育及成熟中的表达模式分析

张新富, 王玉玲, 张晓菲, 王然, 杨绍兰

(青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 本研究以荏梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Chili)果实为材料, 分析了内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EGase)基因 *PbEG3* 和 *PbEG4* 在果实发育及成熟衰老时期的表达模式。荏梨果实中 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达量均于发育时期呈现峰值, 其中, *PbEG3* 的基因表达量在花后 70 d 达到峰值 0.31, 花后 130 d 降至 0.003; 而 *PbEG4* 的基因表达峰值于花后 110 d 出现, 为 0.14, 花后 130 d 降为 0.005, 与 EGase 的活性变化趋势一致。0 °C 贮藏期间, 荏梨果实中 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达量均呈下降趋势, 且二者均在采收点呈现最大值, 其中 *PbEG3* 于采后 60 d 表达量最低, 之后表达量略有升高; 而 *PbEG4* 在贮藏期间的表达量均较低。采后乙酰水杨酸(ASA)处理能够减少荏梨果实的失重, 抑制其可溶性果胶的增加, 降低 EGase 活性, 延缓纤维素的降解, 从而推迟果实的成熟衰老进程。*PbEG3* 和 *PbEG4* 可能与荏梨果实的生长发育有关, 未参与其采后衰老进程。

**关键词:** 荏梨; 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2017)1-62-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.010

## Analysis of the Expression Pattern of Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase Gene during Development and Maturation of Chili Pear

ZHANG Xin-fu, WANG Yu-ling, ZHANG Xiao-fei, WANG Ran, YANG Shao-lan

(Qingdao Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding in Horticultural Plants, College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The expression patterns of *PbEG3* and *PbEG4*, which encode endo- $\beta$ -1,4-glucanase (EGase), were analyzed during fruit development, maturation, and senescence of the chili pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Chili). Both *PbEG3* and *PbEG4* showed the highest expression during the fruit development period. The highest levels of expression of *PbEG3* and *PbEG4* were found to be 0.31 and 0.14, at 70 d and 110 d after anthesis, respectively. At 130 d after anthesis, the expression levels of *PbEG3* and *PbEG4* decreased to 0.003 and 0.005, respectively. The expression pattern of *PbEG4* was found to be consistent with the enzyme activity of EGase. During storage at 0 °C, the expression of both *PbEG3* and *PbEG4* exhibited a decreasing trend, and was the highest on the day of harvest. *PbEG3* expression was lowest at 60 d after harvest, and then increased slightly, while *PbEG4* expression was consistently low during storage. Postharvest acetylsalicylic acid (ASA) treatment decreased fruit weight loss, inhibited the increase of soluble pectin content, reduced the activity of EGase, and delayed the degradation of cellulose, thereby delaying the processes of fruit ripening and senescence. These results indicated that *PbEG3* and *PbEG4* might be related to the growth and development of chili pear, but not the senescence process.

**Key words:** chili pear; endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene; gene expression

果实的成熟软化是一个复杂的过程。植物细胞壁

收稿日期: 2015-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201608); 国家现代农业(梨)产业技术体系建设专项(nycytx-29-06); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2010NY009); 山东省高等学校科技计划项目(J09LC13)

作者简介: 张新富(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品加工贮藏

通讯作者: 杨绍兰(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果实采后生理与分子生物学

的主要成分包括果胶、纤维素、半纤维素和蛋白质等, 研究认为, 果实在成熟软化过程中其细胞壁成分果胶、纤维素和半纤维素等会发生降解<sup>[1,2]</sup>。多种酶类参与了果实的后熟软化, 如多聚半乳糖醛酸酶(PG)、 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Gal)、果胶甲酯酶(PME)、扩张蛋白(Expansin)、内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EGase)、木葡聚糖内糖基转移酶(XET)和阿拉伯糖苷酶(Afase)等<sup>[3,4]</sup>。EGases 是一类由细菌、真菌、昆虫和植物产生的一种水解酶, 植物 EGase 属于内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶第

九家族,具有 1,4- $\beta$ -葡聚糖主链的多聚糖,如纤维素等分子能被 EGase 催化水解,并被随机作用降解成为糊精或寡聚糖<sup>[5]</sup>。EGase 基因分  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三类,是多基因家族<sup>[6]</sup>,这些结构不同的家族成员在植物生长发育过程中共同作用,因此克隆这些 EGase 基因具有重要的意义。目前,已从拟南芥<sup>[7,8]</sup>、砂梨<sup>[9]</sup>、草莓<sup>[10,11]</sup>、番茄<sup>[12-14]</sup>、荔枝<sup>[15]</sup>、柿<sup>[16]</sup>和西洋梨<sup>[17,18]</sup>等多种植物中克隆获得了 EGase 的相关基因。

研究表明,EGase 对植物体的生长发育具有广泛作用,与细胞伸长<sup>[7,8,15]</sup>、果实成熟软化<sup>[12,19,20]</sup>和组织器官脱落<sup>[13,14]</sup>等有密切关系。近年来,关于 EGase 参与植物细胞伸长的研究已有报道。豌豆中 *EGL1* 在伸长的黄化苗上胚轴中最为丰富,其次是迅速生长的花和幼荚<sup>[21]</sup>。拟南芥中 *cell* 在花序伸长区域表达量高,但在完全伸展的叶片及花序柄的基部节间无表达;在矮化处理植株的短花序茎伸长区域中,*cell* 的表达量显著低于在正常植株相应区域的表达量<sup>[8]</sup>。其次,EG 基因的表达与植物果实成熟软化的启动也有重要关系<sup>[22]</sup>。*Avocell* 在未成熟的鳄梨果实中表达量较低,但随着果实成熟其表达量明显增加;而 *Avocel2* 在果实成熟后期表达不显著。因此推断 *Avocell* 基因可能在果实成熟过程中起主要作用<sup>[23]</sup>。

荏梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Chili) 是山东栽培的白梨系统中的优良品种,但荏梨果实在采后贮藏过程中易发生果皮皱缩和腐烂褐变,并伴随果肉粗糙等现象,严重影响了果实的外观品质和食用价值,制约了其在市场上的流通和供应期<sup>[24]</sup>。前期研究发现,乙酰水杨酸 (ASA) 处理可延缓鸭梨果实的硬度下降,减轻果实的失重,抑制果实的腐烂和乙烯释放速率,维持鸭梨果实较好的外观品质和食用品质<sup>[25]</sup>,因此,本研究以荏梨果实为试材,克隆了 EGase 基因 *PbEG3* 和 *PbEG4*,分析了二者的基因表达模式,并对荏梨果实进行 ASA 处理,探究 ASA 处理对果实贮藏期间衰老软化的影响,以及对 *PbEG3* 和 *PbEG4* 基因表达模式的影响,以期获得 *PbEG* 基因在荏梨果实发育和成熟衰老中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

本试验于 2012 年在青岛农业大学莱阳果树实验站进行,于荏梨盛花后 25 d 开始,每隔 15 d 采样一次,至果实采收。采摘的样品当天运抵实验室。果实去掉果皮和果心,将果肉切成小块混合后用液氮处理,置于 -70 °C 超低温冰箱保存。

荏梨成熟果实于 2012 年 10 月 12 日采自莱阳试验基地,采后当天运抵实验室,挑选大小均匀、成熟度相对一致的果实供试验用。选取部分果实以 1.0 mmol/L ASA (pH 3.5) 浸果处理 5 min,晾干后置于 0 °C 贮藏<sup>[25]</sup>。每隔 15 d 随机取 10 个果实,进行乙烯等生理指标的测定,并去皮后切 1 cm<sup>3</sup> 的小块置于液氮中速冻,存于超低温冰箱备用。

### 1.2 果肉总 RNA 提取及 cDNA 的合成

果肉总 RNA 提取。方法参照 TianGen RNA plant Reagent (TianGen, 中国) 说明书操作,采用 DNase (Fermentas, 立陶宛) 去除 DNA 污染。第一条 cDNA 的逆转录按照 Revert Aid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, 立陶宛) 试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 q-PCR 分析

对各个处理的果实进行果肉 RNA 的提取以及 cDNA 第一链反转录 (Fermentas, 立陶宛)。q-PCR 反应体系如表 1 所示。以梨 *Actin* 基因作为内参,基因序列为:上游引物 5'-ATTGGAGCTGAGAGATTCCGGT-3',下游引物为 5'-GTCTCATGAATGCCAGCAGCTT-3'。*PbEG3* 和 *PbEG4* 的 q-PCR 扩增引物分别为: *PbEG3SP*: 5'-TGCAAAGCCGGGTCTAGATA-3', *PbEG3AP*: 5'-ATGAAAGTAGGCCACCAAC-3'; *PbEG4SP*: 5'-TCGTAGGAACGC TGGCTTAT-3', *PbEG4AP*: 5'-ACCTTGACCGTT TGTGCTTC-3'。q-PCR 在 real-time PCR 仪器上操作 (Roche 480, 瑞士)。每次 PCR 设阴性对照。扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环。每个样品 3 次重复。数据分析采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法<sup>[26]</sup>。

表 1 q-PCR 反应体系

Table 1 q-PCR reaction system

| Reagents                                | Volume/ $\mu$ L |
|-----------------------------------------|-----------------|
| Maxima SYBR Green q-PCR Master Mix (2x) | 10              |
| Forward primer                          | 0.4             |
| Reverse primer                          | 0.4             |
| Water                                   | 7.2             |
| Template cDNA (10x)                     | 2               |
| Total volume                            | 20              |

### 1.4 纤维素含量测定

参考植物生理实验技术<sup>[27]</sup>。

### 1.5 纤维素酶活测定

参考果蔬采后生理生化实验指导<sup>[28]</sup>。

### 1.6 可溶性果胶含量测定

参考 Brummell 等<sup>[4]</sup>的方法。

### 1.7 数据分析

实验均做 3 次重复, 实验数据采用 Excel 进行处理分析, 并使用 origin 6.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 荏梨果实发育时期 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达模式

因表达模式

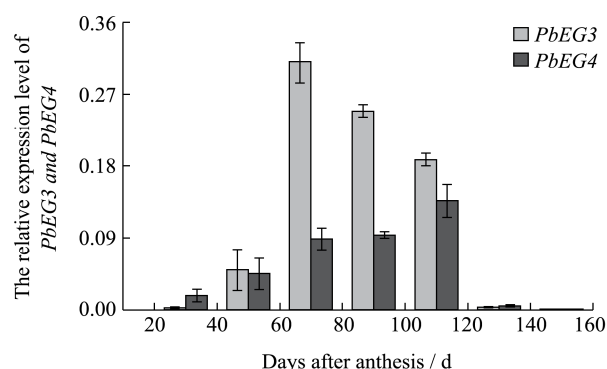


图 1 荏梨果实发育阶段 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达模式  
Fig.1 Expression patterns of *PbEG3* and *PbEG4* during fruit development

由图 1 可知, 荏梨果实中 *PbEG3* 和 *PbEG4* 均于发育时期出现基因表达峰值, 且 *PbEG3* 的基因表达高峰出现时间早于 *PbEG4*: *PbEG3* 在幼果期的基因表达量呈上升趋势, 并于花后 70 d 出现表达高峰, 表达量为 0.31, 之后逐渐下降, 至花后 130 d 其表达量降至 0.003; *PbEG4* 在花后 110 d 出现基因表达峰值 0.14, 随后迅速下降, 至花后 130 d 其表达量降为 0.005。在梨果实发育过程中, 前期主要是细胞分裂, 组织分化, 后期则是细胞膨大。*PbEG3* 和 *PbEG4* 在花后 130 d 到果实成熟期间表达量均很低 (图 1), 暗示其可能主要在果实的细胞分裂阶段起作用。

### 2.2 荏梨果实发育时期 EGase 活性与纤维素含量变化趋势

如图 2 所示, EGase 活性在荏梨发育阶段呈现峰值。自花后 30 d 开始, EGase 活性逐渐升高, 并于花后 90 d 达到最大值 5.27  $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{g})$ , 随后逐渐降低。此外, EGase 的活性变化趋势与 *PbEG4* 基因表达趋势一

致, 而 *PbEG3* 基因表达的峰值出现时间早于 EGase 活性的峰值出现时间。

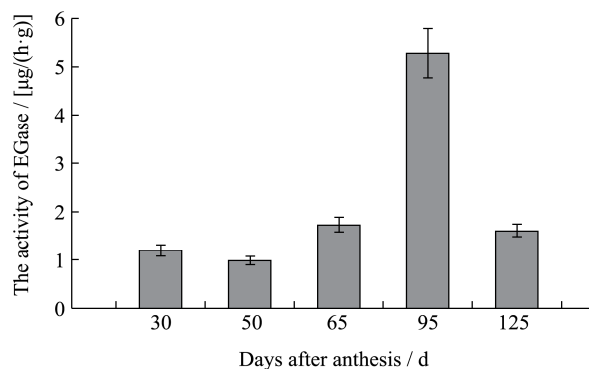


图 2 荏梨果实发育阶段 EGase 活性

Fig.2 Activity of EGase during fruit development

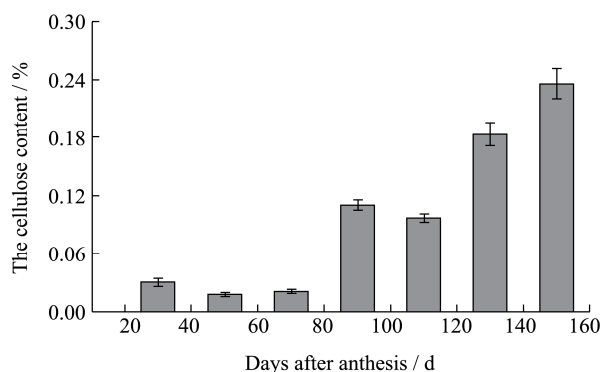


图 3 荏梨果实发育阶段的纤维素含量

Fig.3 Cellulose content evolution during fruit development

荏梨果实发育阶段的纤维素含量变化如图 3 所示, 果实的纤维素含量在花后 90 d 之前含量较低, 最后逐渐上升。本试验结果显示, 发育阶段的荏梨果实中, 随着 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的作用, EGase 活性逐渐升高, 同时纤维素的含量也逐渐增加, 从而表明在果实发育时期, EGase 可能未作用于纤维素的降解, 其可能与果实的生长发育相关。吴富旺等克隆了两个荔枝果实 EG 基因, 发现 *LcEG1* 在果皮和果肉中均表达, 且随着果实的发育, *LcEG1* 在果皮中的表达下降, 但在果肉中的表达量增加; *LcEG2* 则仅在果肉生长的前期表达, 未在果皮中表达, 表明 *LcEG1* 可能与荔枝果皮和果肉的发育相关, 而 *LcEG2* 可能仅与果肉早期的生长有关<sup>[15]</sup>。

### 2.3 荏梨果实贮藏期间 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达模式

根据 *PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因非编码区设计 q-PCR 引物, 进行表达分析, 结果如图 4 所示。0  $^{\circ}\text{C}$  贮藏时期, 荏梨果实中 *PbEG3* 和 *PbEG4* 在贮藏初期 (0 d) 的基因表达量均最高, 随后皆下降。*PbEG3*

的表达量在贮藏前期呈下降趋势,于贮藏 60 d 时表达量最低,之后表达量略有升高;而 *PbEG4* 只有在贮藏初期(0 d)的表达量最高,之后的表达量均维持在较低水平。贮藏前期,ASA 处理能够抑制 *PbEG3* 的基因表达,并且 ASA 处理的果实中 *PbEG3* 的基因表达量在贮藏期间均维持在较低水平。而 ASA 处理果实中 *PbEG4* 的表达量在贮藏期间与对照果实无明显差异,表达量均较低。我们获得的两个 EG 基因与其在西洋梨中的表达模式不同,西洋梨中获得的 *PcEG1* 和 *PcEG2* 在冷藏后货架期上的表达模式出现很大差异:*PcEG1* 为组成型表达,而 *PcEG2* 则是在贮藏末期表达出现高峰<sup>[18]</sup>。

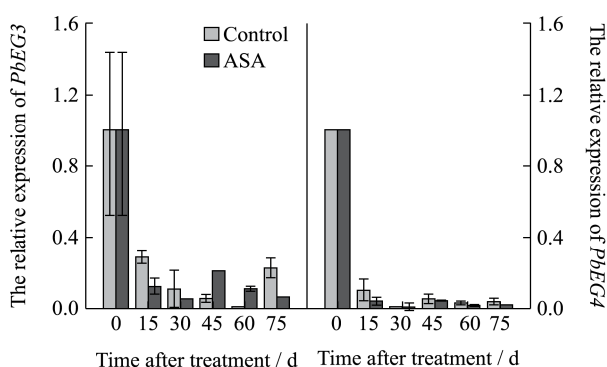


图 4 *PbEG3* 和 *PbEG4* 在荏梨贮藏时期的表达水平

Fig.4 Expression patterns of *PbEG3* and *PbEG4* during fruit storage

## 2.4 荏梨果实贮藏期间失重率和可溶性果胶含量的变化

贮藏过程中,荏梨果实的失重率呈上升趋势,表明果实逐渐失水,果皮皱缩,品质下降,而 ASA 处理果实的失重率明显低于对照果实(图 5),表明 ASA 处理能够减缓果实失水,较好地维持果实品质。

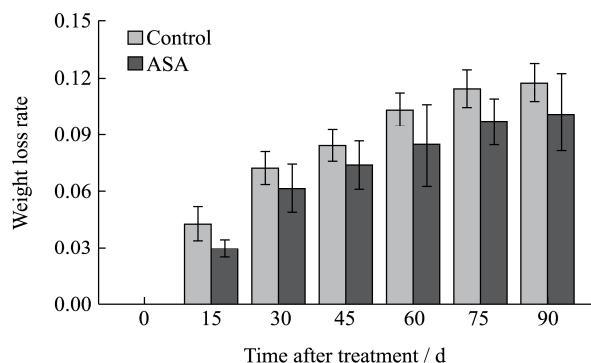


图 5 ASA 处理对荏梨果实贮藏阶段失重率的影响

Fig.5 Effect of ASA treatment on weight loss rate during fruit storage

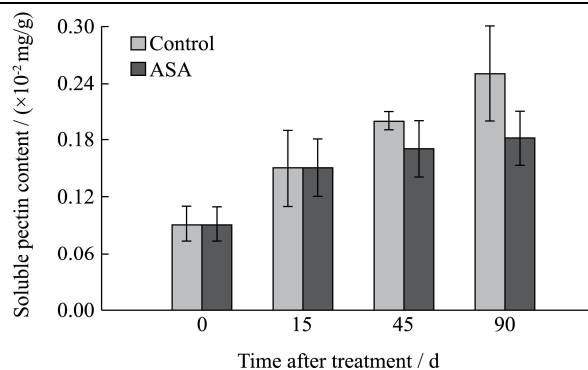


图 6 ASA 处理对荏梨果实贮藏阶段可溶性果胶含量的影响

Fig.6 Effect of ASA treatment on soluble pectin content during fruit storage

在果实成熟过程中,原果胶逐渐转变为可溶性果胶,果实逐渐成熟衰老<sup>[29]</sup>。本研究结果显示,荏梨果实中可溶性果胶含量随贮藏时间的延长逐渐升高,且 ASA 处理果实中可溶性果胶的含量明显低于对照果实(图 6),表明 ASA 处理能够延缓荏梨果实的衰老进程。

## 2.5 荏梨果实贮藏期间纤维素含量和 EGase 活性的变化

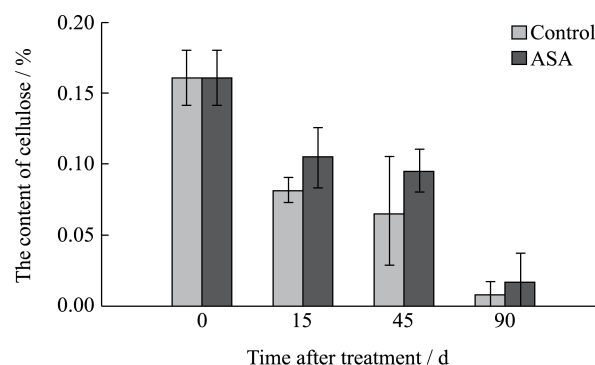


图 7 ASA 处理对荏梨果实贮藏阶段纤维素含量的影响

Fig.7 Effect of ASA treatment on cellulose content during fruit storage

随着贮藏时间的延长,对照果实和 ASA 处理果实中纤维素含量均呈下降趋势,且 ASA 处理果实中纤维素含量下降趋势较缓慢(图 7)。

贮藏过程中,荏梨果实的 EGase 活性于贮藏后 90 d 达到最高,而 ASA 处理果实中 EGase 的活性均处于较低水平,且始终低于对照果实,表明 ASA 处理能够抑制荏梨果实中 EGase 的活性(图 8)。

综上所述,EGase 活性变化与果实成熟衰老进程一致,随着酶活性的升高,纤维素含量逐渐下降,可溶性果胶含量逐渐升高,果实趋于衰老。而 ASA 处

理抑制了 EGase 活性,从而延缓了荏梨果实纤维素的降解,降低了可溶性果胶的含量,延缓了果实的衰老进程。因此,EGase 在荏梨果实的成熟衰老进程中起着重要作用。

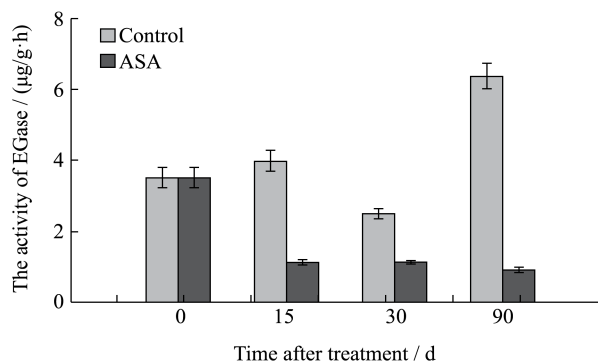


图8 ASA处理对荏梨果实贮藏阶段EGase活性的影响

Fig.8 Effect of ASA treatment on EGase activity during fruit storage

### 3 讨论

根据所编码的氨基酸残基特征,EGases 基因家族可分为两类<sup>[30]</sup>:其中一类的N端含有疏水跨膜区,属于跨膜蛋白型;另一类的N端则含有信号肽,属于分泌型蛋白。分泌型EG蛋白与果实成熟、器官脱落和细胞伸长等有关<sup>[6]</sup>。蛋白跨膜区分析发现,本试验得到的 *PbEG3* 和 *PbEG4* 没有跨膜区域,推测二者属于分泌型蛋白。

前期研究表明,番茄中EGase基因 *Cel4* 在雌蕊发育早期表达,能够促进雌蕊的发育,同时 *Cel4* 在黄化苗下胚轴的生长区域和幼嫩叶片中均有较高的表达量,但在成熟的组织器官、组织脱落区和果实中表达量则较低或不表达,由此表明 *Cel4* 的表达与胚轴、叶片和雌蕊细胞的快速增大密切相关<sup>[31]</sup>。本试验中, *PbEG3* 和 *PbEG4* 均在荏梨果实发育中期呈现峰值,该阶段为果实快速生长期,即果实膨大期,其编码的EGase也与果实的生长发育进程一致,从而表明二者可能参与了荏梨果实细胞分裂,对果实快速膨大起促进作用。

在果实成熟软化过程中,多种不同的EGases通过水解具有1,4-β-葡聚糖酶主链的多聚糖,改变细胞壁的多孔性和黏性,促使细胞壁修饰酶更加容易接近其作用的底物,从而更快地引起果实软化<sup>[5]</sup>。荏梨果实贮藏期间,随着EGase活性的升高,细胞壁中纤维素逐渐降解,可溶性果胶上升,果实趋于衰老。*PbEG3* 和 *PbEG4* 的基因表达量于采收点最高,随后下降,因此 *PbEG3* 和 *PbEG4* 可能未参与果实的采后衰老进程。植物EGase为多基因编码家族,可能存在其它的EG

基因与荏梨果实的采后衰老相关。

### 4 结论

本研究从荏梨果实中获得两个EG基因 *PbEG3* 和 *PbEG4*,研究了其在果实发育和贮藏阶段的表达模式。结果表明, *PbEG3* 和 *PbEG4* 可能在荏梨果实的生长发育过程起着重要作用,而未参与荏梨果实的采后成熟衰老。

### 参考文献

- [1] Brummell D A. Cell wall disassembly in ripening fruit [J]. *Functional Plant Biology*, 2006, 33(2): 103-119
- [2] 吴彩娥,王文生,寇晓虹.果实成熟软化机理研究进展[J]. *果树学报*,2001,18(6):365-369  
WU Cai-e, WANG Wen-sheng, KOU Xiao-hong. Advance in research on mechanism of fruit ripening and softening [J]. *Journal of Fruit Science*, 2001, 18(6): 365-369
- [3] Bennett A B, Labavitch J M. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins [J]. *Plant Science*, 2008, 175(1): 130-136
- [4] Brummell D A, Harpster M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2001, 47(1-2): 311-340
- [5] 欧阳杰,蒋建雄,张天真,等.内切-β-1,4-葡聚糖酶在植物细胞生长发育中的作用[J]. *西北植物学报*,2007,27(4):844-851  
OU Yang-jie, JIANG Jian-xiong, ZHANG Tian-zhen, et al. The function of endo-1,4-β-glucanase on plant cell growth and development [J]. *Acta Bot. Boreal-Occident. Sin.*, 2007, 27(4): 844-851
- [6] Libertini E, Li Y, McQueen-Mason S J. Phylogenetic analysis of the plant endo-1,4-β-glucanase gene family [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(5): 506-515
- [7] Sato S, Kato T, Kakegawa K, et al. Rapid paper-role of the putative membrane-bound endo-1,4-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42(3): 251-263
- [8] Shani Z, Dekel M, Roiz L, et al. Expression of endo-1,4-β-glucanase (*cell1*) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 1067-1074
- [9] 丛郁,李慧,颜志梅,等.砂梨2个内切-β-1,4-葡聚糖酶基因cDNA的克隆及其在果实贮藏过程中的表达分析[J]. *江苏农业学报*,2010,26(2):383-389  
CONG Yu, LI Hui, YAN Zhi-mei, et al. Cloning two members of endo-1,4-β-glucanase gene family from sandy

- pear and their expression characteristics during shelf life [J]. Jiangsu J. of Agr. Sci., 2010, 26(2): 383-389
- [10] Arpster M H, Brummell D A, Dunsmuir P. Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4-beta-glucanase gene in strawberry [J]. Plant Physiol., 1998, 118(4): 1307-1316
- [11] Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, et al. A novel E-type endo- $\beta$  (1,4)-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits [J]. Plant Mol Biol., 1999, 40(2): 323-332
- [12] Real M D, Company P, Garcia-Agustín P, et al. Characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase cell protein in fruit during ripening and after fungal infection [J]. Planta, 2004, 220(1): 80-86
- [13] Kalaitzis P, Hong S B, Solomos T, et al. Molecular characterization of a tomato endo-beta-1,4-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit [J]. Plant Cell Physiol., 1999, 40(8): 905-908
- [14] Gonzalez-Bosch C, Del Campillo E, Bennett A B. Immunodetection and characterization of tomato endo-[beta]-1,4-glucanase cell protein in flower abscission zones [J]. Plant Physiol., 1997, 114(4): 1541-1546
- [15] 吴富旺, 邝健飞, 陆旺金, 等. 荔枝果实内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶基因(EG)的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(12): 1733-1740  
WU Fu-wang, KUANG Jian-fei, LU Wang-jin, et al. Cloning and expression analysis of EG genes in litchi fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(12): 1733-1740
- [16] 宋康华, 饶景萍, 常晓晓, 等. 柿果实内切-1,4- $\beta$ -葡聚糖酶基因克隆与定量表达分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 1893-1900  
SONG Kang-hua, RAO Jing-ping, CHANG Xiao-xiao, et al. Studies on cloning and real-time expression of endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene in persimmon fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(10): 1893-1900
- [17] Sekine D, Munemura I, Gao M, et al. Cloning of cDNAs encoding cell-wall hydrolases from pear (*Pyrus communis*) fruit and their involvement in fruit softening and development of melting texture [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126(2): 163-174
- [18] Hisawa K, Kunigasa Y, Amano S, et al. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(383): 771-779
- [19] Chourasia A, Sane V A, Singh R K, et al. Isolation and characterization of the *MiCell* gene from mango: ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening [J]. Plant Growth Regul., 2008, 56(2): 117-127
- [20] Lee Y K, Kim I J. Modulation of fruit softening by antisense suppression of endo- $\beta$ -1,4-glucanase in strawberry [J]. Mol. Breeding, 2011, 27(3): 375-383
- [21] 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 Physiology, 1996, 110(1): 163-170
- [22] Molhoj M, Pagant S, Hofte H. Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(12): 1399-1406.
- [23] Cass L G, Kirven K A, Christoffersen R E. Isolation and characterization of a cellulase gene family member expressed during avocado fruit ripening [J]. Molecular and General Genetics, 1990, 223(1): 76-86
- [24] 鞠志国, 朱广廉, 曹宗巽. 莱阳茺梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 356-361  
JU Zhi-guo, ZHU Guang-lian, CAO Zong-xun. The compartmentation of polyphenol oxidase and its substrates in relation with fruit browning of Laiyang Chi Li (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1988, 14(4): 356-361
- [25] 杨绍兰, 王然. 乙酰水杨酸处理对鸭梨果实货架期品质特性的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 89-92  
YANG Shao-lan, Wang Ran. Effects of acetylsalicylic acid treatment on the Yali pear fruit shelf-life quality characters [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(18): 89-92

(下转第7页)