

黄秋葵果实质地变化的生化和转录组联合分析

张国芹, 牟建梅, 陈虎根
(苏州市农业科学院, 江苏苏州 215106)

摘要: 黄秋葵果实发育过程质地易木质化变硬, 严重影响商品价值。为探究黄秋葵果实质地变硬的机制, 选择易老化变硬的Z06和不易老化的苏优葵3号两个品种在其果实3个发育时期进行生化指标的测定及转录组测序。结果发现, 品种间或不同发育时期果实质地的差异主要是由于木质素积累导致的木质化, 纤维素和原果胶同时也起到积极的作用。转录组学分析表明, 相同品种在不同果实发育时期的差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)主要在苯丙烷生物合成和次级代谢产物的生物合成途径显著富集; 而相同时期两品种间的差异表达基因除了与苯丙烷生物合成途径有关, 光合作用和光合作用天线蛋白途径也起重要作用。在果实成熟质地变硬阶段, 苯丙氨酸氨酶(*PAL*, phenylalanine ammonia-lyase)基因是影响木质素积累的关键基因; 蔗糖合成酶3(*SUS3*, sucrose synthase)基因对纤维素的积累贡献最大, 而 β -葡萄糖苷酶(*BGLU*, β -D-glucosidase)基因的下调表达也是促进纤维积累的重要因素; 半乳糖醛酸转移酶6(*GAUT6*, galacturonosyltransferase)基因和*SUS6*基因对原果胶的积累贡献较大, 但大部分果胶酯酶(*PME*, pectinesterase)基因和聚半乳糖醛酸酶(*PG*, polygalacturonase)基因对原果胶的积累均呈负贡献。木质素合成相关基因*PAL6*、*PAL5*、*PAL1*及肉桂酰辅酶A还原酶2(*CCR2*, cinnamoyl-CoA reductase)基因、细胞色素P450亚酶84A1(*CYP84A1*, cytochrome P450)基因、*CYP73A12*, 以及光合途径相关基因放氧增强蛋白2(*PSBP2*, oxygen-evolving-complex)基因和叶绿素a/b结合蛋白2(*CABIR*, chlorophyll a/b binding protein)基因是影响品种质地差异的重要基因。

关键词: 黄秋葵; 果实老化; 转录组; 木质素; 关键基因

Combined Biochemical and Transcriptomic Analysis of the Okra Fruit Texture Changes

ZHANG Guo-qin, MOU Jian-mei, CHEN Hu-gen
(Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu Suzhou 215106)

Abstract: The okra fruit is easily lignified, whereas the fruit lignification would decrease the commercial value. In order to explore the aging mechanism of okra fruit, two cultivars, Z06 (easy to age), and Suyoukui 3 (not easy to age), were used for physiological indicators quantification and transcriptome sequencing at three developmental stages. The differences in fruit texture between cultivars or at different developmental stages was mainly caused by the accumulation of lignin, while cellulose and protopectin were also found with positive effects. The differentially expressed genes (DEGs) of the same cultivar at different fruit development stages were significantly enriched in the phenylpropane biosynthesis and secondary metabolite biosynthesis pathways. While the DEGs between the cultivars were found with enrichments in the phenylpropane biosynthesis pathway, the photosynthesis and photosynthesis antenna protein pathways. During the hardening stage of okra fruit, the gene *PAL* was found as key regulator that affected lignin accumulation. The *SUS3* gene contributed predominantly to the accumulation of cellulose, and the down-regulated expression of the *BGLU* gene was also an important factor in promoting the accumulation of cellulose. Two genes *GAUT6* and *SUS6* largely contributed to the accumulation

收稿日期: 2022-08-22 修回日期: 2022-09-01 网络出版日期: 2022-10-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220822002>

第一作者研究方向为蔬菜种质创新及栽培技术研究, E-mail: guoqin1981@163.com

通信作者: 牟建梅, 研究方向为蔬菜种质创新及栽培技术研究, E-mail: thmj@163.com

基金项目: 作物生物学国家重点实验室开放课题(2021KF12)

Foundation project: Open Project of the State Key Laboratory of Crop Biology (2021KF12)

of protopectin, but most of the *PME* and *PG* genes had a negative contribution to the accumulation of protopectin. Lignin synthesis-related genes *PAL6*, *PAL5*, *PAL1*, *CCR2*, *CYP84A1*, *CYP73A12*, and photosynthetic pathway-related genes *PSBP2* and *CABIR* were important genes that affected the texture differences of two cultivars.

Key words: okra; fruit aging; transcriptome; lignin; key genes

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) 起源于非洲, 在热带及亚热带地区广泛种植。据 FAO (<https://www.fao.org/faostat>) 统计, 2010 年以来, 黄秋葵在世界的栽培面积增长迅速, 截止到 2020 年, 世界总栽培面积提升了 131.5%。因其美味的口感、丰富的营养、较高的医药价值使其深受人们喜爱^[1]。但黄秋葵的果实收获期较短, 结果后 5~7 d 果实质地变硬, 发生木质化, 严重影响黄秋葵的商品价值。

植物组织的质地受细胞形态、膨压以及细胞壁结构影响^[2], 而细胞壁强度决定组织硬度。木质素、纤维素、果胶等是细胞壁的重要组分, 其形态及连接决定了果肉细胞的细胞壁机械性能^[3], 已有大量研究表明这些细胞壁组分含量与果实质地呈显著正相关^[4-5]。木质素积累是果实木质化的主要原因^[6-7], 而木质素的合成受苯丙烷代谢途径的相关酶调控。Liu 等^[8]发现木质素合成途径中的 *EjPAL2*、肉桂醇脱氢酶 1 (*EjCAD1*, cinnamyl-alcohol dehydrogenase) 基因、*EjCAD3*、4-香豆酰-CoA 连接酶 (*4CL*, 4-coumaryl-CoA ligase) 基因、咖啡酸-O-甲基转移酶 (*COMT*, caffeic acid O-methyltransferase) 基因等响应枇杷采后木质化过程。刘恋等^[9]同样发现木质素合成相关基因的上调表达是柑橘果皮硬度、韧性及木质素含量较高的重要原因。纤维素也是影响组织机械强度的重要因素, Ren 等^[10]研究表明, 黄秋葵果实衰老主要由于纤维素的积累导致细胞壁增厚, 但也有研究表明果实质地的硬化不受纤维素含量影响^[11], 因此, 纤维素与黄秋葵果实质地的关系有待进一步探究。果胶对细胞壁生物力学起重要作用, 其直接促进细胞壁中纤维素微纤维的交联^[12], 果胶结构的变化(溶解、去酯化和解聚)导致细胞壁松动和解体, 是果实成熟软化的重要原因^[13]。

本研究以果实成熟阶段质地变化进程显著不同的两个黄秋葵品种苏优葵 3 号和 Z06 为试验材料, 通过测定果实质地变化过程细胞壁组分的变化, 联合转录组测序, 明确黄秋葵果实质地变硬的主要原因, 分析黄秋葵果实质地变化的生理与分子机制, 探明影响黄秋葵果实质地的关键基因, 进而为黄秋葵栽培模式创新提供理论依据, 同时为其育种提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试验设计

选择果实相同发育阶段质地显著不同的两个黄秋葵品种苏优葵 3 号和 Z06 为试验材料, 2020 年 4 月 10 日播种于苏州市农业科学院蔬菜所基地, 其中苏优葵 3 号为质地脆嫩品种, Z06 为质地易老化变硬品种(图 1)。于 9:00~10:00 分别收获开花后 3 d、5 d 和 7 d 的黄秋葵果实。每个时期取 3 个生物学重复, 每个重复选取不同植株上的 8 个果实, 去除果实头部、尾部及种子, 留取中间 3 cm 的果实部分, 将每个重复的取样部分充分混匀, 分为 3 部分并迅速置于液氮中, 保存于 -80 °C 冰箱中分别进行后续细胞壁组分的测定、转录组测序和荧光定量试验。



图 1 老化进程不同的 2 个黄秋葵品种(花后 5 d)

Fig.1 Two okra varieties with different aging processes (5 days after flowering)

1.2 果实硬度、纤维素、半纤维素、木质素、果胶含量的测定

果实硬度使用 GY-4 硬度计(莱恩德, 中国)测定; 纤维素采用硫酸蒽酮比色法测定^[14]; 半纤维素采用盐酸水解法测定^[15]; 木质素采用浓硫酸法测定^[15]; 可溶性果胶, 原果胶采用咔唑比色法测定^[16]。

1.3 RNA 提取

准确称取 100 mg 黄秋葵果实使用液氮研磨, 并置于 1.5 mL 离心管中, 使用 Plant RNA Kit (Omega, 美国)提取 RNA。对核酸样本进行琼脂糖凝胶电泳, 目的是检验核酸样本的完整性; 使用 NanoDrop One (Thermo Fisher, 美国)检测核酸的 OD 值, 以测定核酸的纯度。

1.4 文库构建与转录组测序

提取后,使用寡核苷酸磁珠富集真核 mRNA,使用 Ribo-zero™ Magnetic Kit (Epicentre, 美国) 去除原核核糖体 RNA (rRNA)。然后使用裂解缓冲液将富集的 mRNA 片段化,并使用随机引物将其转录成互补 DNA (cDNA)。使用 QiaQuick PCR Purification Kit (QIAGEN, 德国) 纯化 DNA 片段,进行末端修复、聚腺苷酸化并连接到 Illumina 测序接头。通过琼脂糖凝胶电泳分离连接产物,使用 PCR 进行扩增,在广州基迪奥生物公司使用 Illumina HiSeq™ 4000 进行测序。

1.5 差异表达基因的鉴定

通过删除包含接头、未知“N”碱基和低质量的 Reads,获得高质量的 Clean data。随后,进行气相色谱分析并计算读数的 Q20 和 Q30。使用 Trinity 软件^[17]对参考基因组进行从头转录组组装。使用 StringTie 软件^[18]计算每千碱基转录物片段/百万映

射读取数 (FPKM, fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值,以量化单基因的表达丰度和变异。同时,使用 DESeq2 和 EdgeR 软件^[17]分析两个不同组之间 RNA 的差异表达。利用错误发现率 (FDR, false discovery rate) 校正 P 值,根据差异倍数 (FC, fold change) 确定差异表达基因,使用 $P < 0.05$ 和 $|\log_2 FC| \geq 1$ 作为识别基因表达显著差异的阈值。并对筛选的 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.6 实时荧光定量 (qRT-PCR) 验证

选择 10 个显著差异表达的基因验证转录组数据的可靠性。使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物。每个反应体系为 20 μ L, 包含 10 μ L SYBR green Master Mix、0.4 μ L 正向和反向引物以及 2 μ L cDNA。扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 下初始变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 下变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 下退火 30 s, 循环 35 个周期。以 *ACT4* 作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法用于计算每个样品的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列列表

Table 1 Primer sequence listing

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度 ($^{\circ}$ C) Tm	扩增长度 (bp) Amplification length
ACT4	GCATCTCTTAGCACCTTCCAGCAG	AGAAGCACTTCTGTGGACAATGG	59.1	88
ASK8	CCGAAGCAGGTCAGATAA	GCCACTCTCTAAGCACTT	60.2	140
RVE5-	GTCACAGTGGCAGTAGT	CCAGGGTCAAAGACATTAC	59.8	142
RPP25L	GTGAAGCCATTGACTGAG	CATAACCTCTCCCACCAT	59.5	100
At1g16860	GTGCCAAGATGCGTATATG	CAGGAGAAGTAGCGATGT	60.3	92
FRL4B	GCCTTGAGCAGTTAGAGA	GCATAGGACCGCCATTA	59.4	96
CESA4	CGGTTACACCAAGTTCTG	AAGCCTCTCAAGCCATT	59.7	111
PAL	GCTAAGTGGTGAAGAAGTG	GTTCCATTCTCCAGACA	60.0	112
CCR1	TGAAGGAGCGAATGAGAG	CAGGTGAAGCAGTATGGA	59.7	110
SUS1	AATGACCTGTGGACTACC	CTAAATCGCCGTTGTAAGG	60.0	107
BGLU41	CGCCGATACTTCAAGGA	CGAGGAACAGATACTACCA	60.0	148

2 结果与分析

2.1 黄秋葵果实发育过程中硬度与细胞壁组分的变化

随着黄秋葵果实发育,果实硬度逐渐升高,且 Z06 的硬度显著高于苏优葵 3 号 ($P < 0.05$) (图 2)。果实中纤维素、木质素和原果胶的变化与果实硬度类似,开花后 7 d, Z06 的纤维素、木质素和原果胶含量比苏优葵 3 号显著高 21.7%、40.84%、37.47% ($P < 0.05$)。随着果实发育,苏优葵 3 号的半纤维素含量呈现先升高后降低的趋势, Z06 的半纤维素含量呈先降低后升高的趋势,开花后 7 d, Z06 的半纤维素含量比苏优葵 3 号显著高 32.60% ($P < 0.05$)。两品种中可溶性果胶含量随果实发育逐渐升高,而苏优葵

3 号的可溶性果胶含量显著高于 Z06 ($P < 0.05$)。

2.2 转录组数据分析

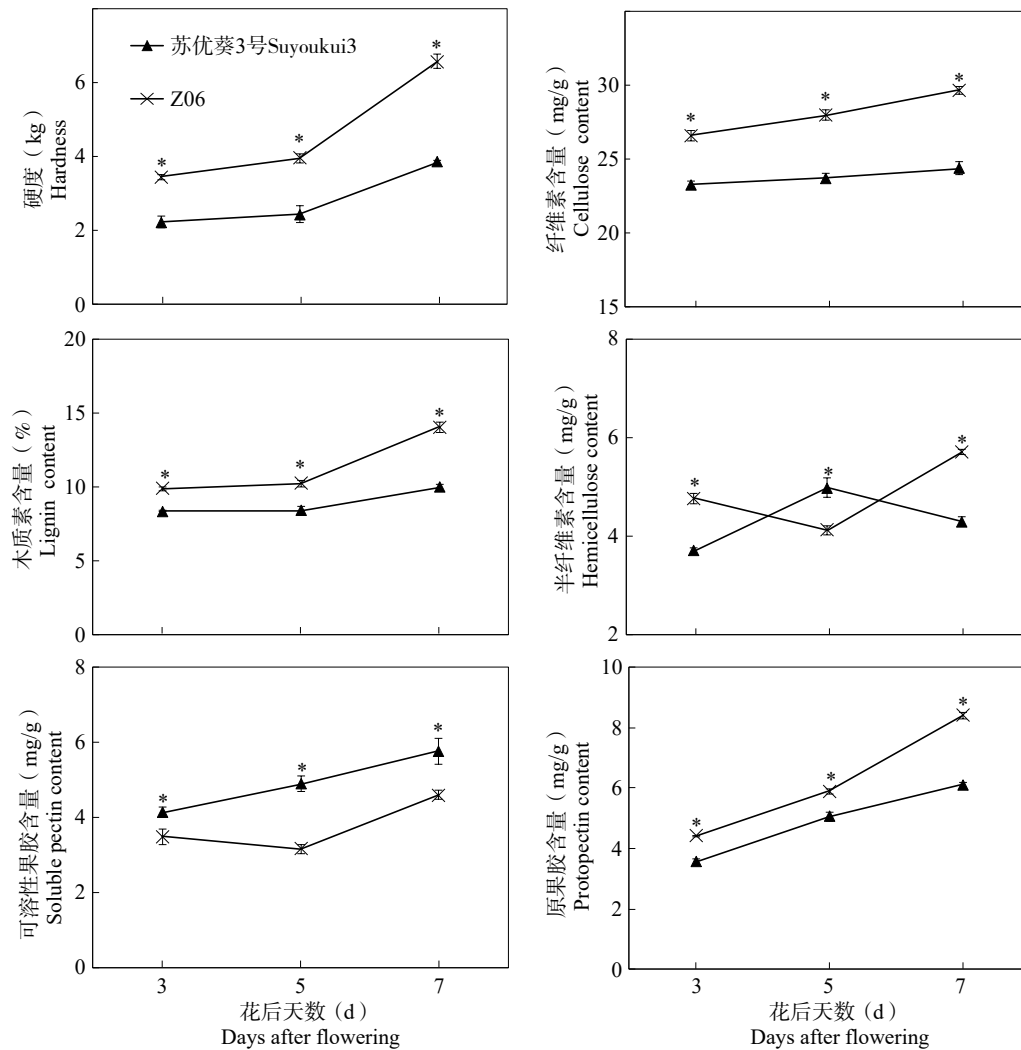
在获得原始测序读数后,评估了测序数据的质量。在删除低质量的 Reads 后,获得了 4000 万到 5500 万 Clean data。各样品中 Q20 碱基百分比均不小于 97%,样品的 GC 含量在 43.46% 至 44.37% 之间。测序错误率在 0.03% 左右,满足后续分析要求 (表 2)。主成分分析 (PCA, principal component analysis) 表明 (图 3A), 开花后 5 d, 苏优葵 3 号和 Z06 之间差异较小,其他各处理均具有较好的重复性和差异性。

2.3 差异表达基因分析

对鉴定的 DEGs 进行分类,不同发育时期相较而言,苏优葵 3 号中 3 个比较组共有 15569 个 DEGs, Z06 中共有 18691 个 DEGs; 在苏优葵 3 号中,开花后 5 d 较

开花后3 d、开花后7 d较开花后5 d、开花后7 d较开花后3 d,有978个共同表达的差异表达基因;在Z06中,开花后5 d较开花后3 d、开花后7 d较开花后5 d、开花后7 d较开花后3 d,有1286个共同表达的差异表达基因。两品种相较而言,3个时期共有6288个DEGs;在3个发育时期,Z06相较于苏优葵3号,有219个共同表达的差异表达基因(图4A)。对差异表达基因进行

聚类分析发现,两品种在同一时期和同一品种在不同发育时期的表达模式具有较大差异(图4B)。同一品种在开花后5 d较开花后3 d,下调基因数高于上调基因;而开花后7 d较开花后5 d,上调基因数高于下调基因。两品种在相同发育时期,Z06较苏优葵3号而言,除开花后3 d上调基因数高于下调基因,其他时期下调基因数均高于上调基因(图3B)。



*表示两品种在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异

*Indicates a significant difference between the two varieties at the $P<0.05$ level

图2 黄秋葵果实老化过程相关品质指标变化

Fig.2 Changes of quality indexes related to okra fruit aging process

2.4 差异表达基因的GO和KEGG富集分析

Gene ontology(GO)可分为生物过程(Biological process)、细胞成分(Cellular component)以及分子功能(Molecular function)三大类功能。对同一品种不同发育时期和相同时期不同品种的DEGs进行GO富集分析,结果发现,差异表达基因在两种富集方式的结果相似,在生物过程(Biological process)中,

代谢过程(Metabolic process)、细胞过程(Cellular process)和单生物过程(Single-organism process)显著富集;在细胞成分(Cellular Component)中细胞(Cell)、细胞组分(Cell part)和细胞器(Organelle)的DEGs数量最多;在分子功能(Molecular Function)中主要在催化活性(Catalytic activity)和物质结合(Binding)中富集显著(图5)。

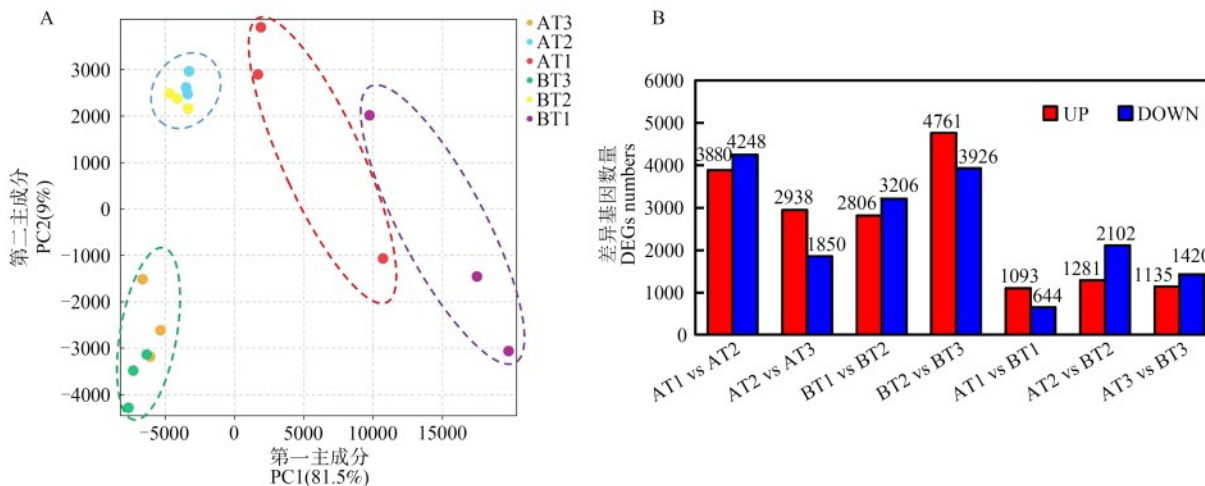
表2 转录组数据质控表

Table 2 Transcriptome data quality control sheet

样品序号 Sample	原始数据 Raw data	有效数据 Clean data	错误率(%) Error rate	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
AT1-1	47007958	46819292	0.03	97.53	93.20	43.99
AT1-2	45172246	44978518	0.03	97.63	93.41	43.46
AT1-3	49023184	48793698	0.03	97.44	93.04	43.97
AT2-1	49867614	49715450	0.03	97.59	93.29	43.91
AT2-2	49072880	48912576	0.03	97.62	93.35	43.96
AT2-3	49296486	49155128	0.03	97.73	93.58	43.90
AT3-1	40713026	40588450	0.03	97.71	93.55	43.71
AT3-2	49066968	48887278	0.03	97.58	93.27	43.78
AT3-3	44540166	44390560	0.03	97.58	93.29	43.78
BT1-1	53597436	53403072	0.03	97.70	93.49	43.98
BT1-2	45836548	45695616	0.03	97.66	93.34	44.22
BT1-3	45542282	45397510	0.03	97.69	93.47	44.37
BT2-1	44478354	44286514	0.03	97.56	93.25	43.67
BT2-2	44557716	44426318	0.03	97.65	93.41	43.82
BT2-3	48467076	48302570	0.03	97.61	93.31	43.88
BT3-1	45458472	45272078	0.03	97.35	92.76	43.74
BT3-2	47433318	47270036	0.03	97.57	93.22	43.78
BT3-3	52676596	52468026	0.03	97.55	93.24	43.57

AT: 苏优葵3号; BT: Z06; AT1、AT2、AT3分别表示AT在开花后3 d、5 d、7 d; BT1、BT2、BT3分别表示BT在开花后3 d、5 d、7 d; -1、-2、-3表示3个重复; 下同

AT: Suyoukui 3; BT: Z06; AT1, AT2 and AT3 represent AT at 3 d, 5 d and 7 d after flowering, respectively; BT1, BT2 and BT3 represent BT at 3d, 5d and 7d after flowering, respectively; -1, -2 and -3 represent three duplicates; The same as below



A: PCA分布图, 红色虚线表示AT3, 紫色虚线表示BT3, 蓝色虚线表示AT2和BT2, 绿色虚线表示AT1和BT1; B: DEGs统计分析, vs: 比较组中均为后者相较于前者而言, 下同

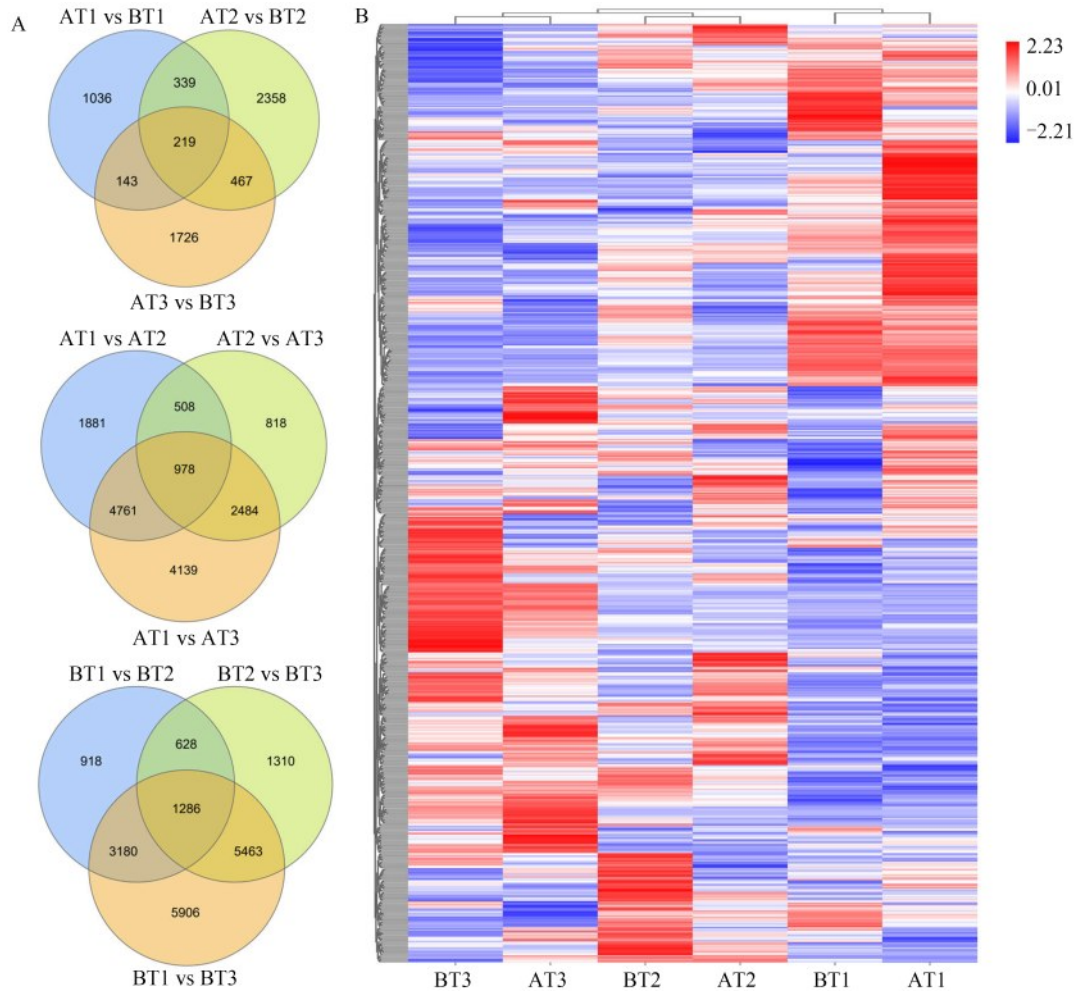
A: PCA distribution map, red dotted lines represent AT3, purple dotted lines represent BT3, blue dotted lines represent AT2 and BT2, and green dotted lines represent AT1 and BT1; B: Statistical analysis of DEGs; vs: In the comparison group, the latter was compared with the former, the same blow

图3 不同转录组样本PCA分析及DEGs统计

Fig.3 PCA analysis of different transcriptome samples and DEGs statistics

利用KEGG对DEGs进行代谢通路富集, 自上而下按 $-\log_{10}(Qvalue)$ 大小排列聚类结果, 发现相同时期不同品种的DEGs主要在代谢途径(Metabolic pathways)、光合(Photosynthesis)和光合作用天线蛋白(Photosynthesis-antenna protein)显著富集(图6A);

而同一品种不同发育时期的DEGs主要在苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)、代谢途径(Metabolic pathways)和次级代谢产物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)显著富集(图6B)。

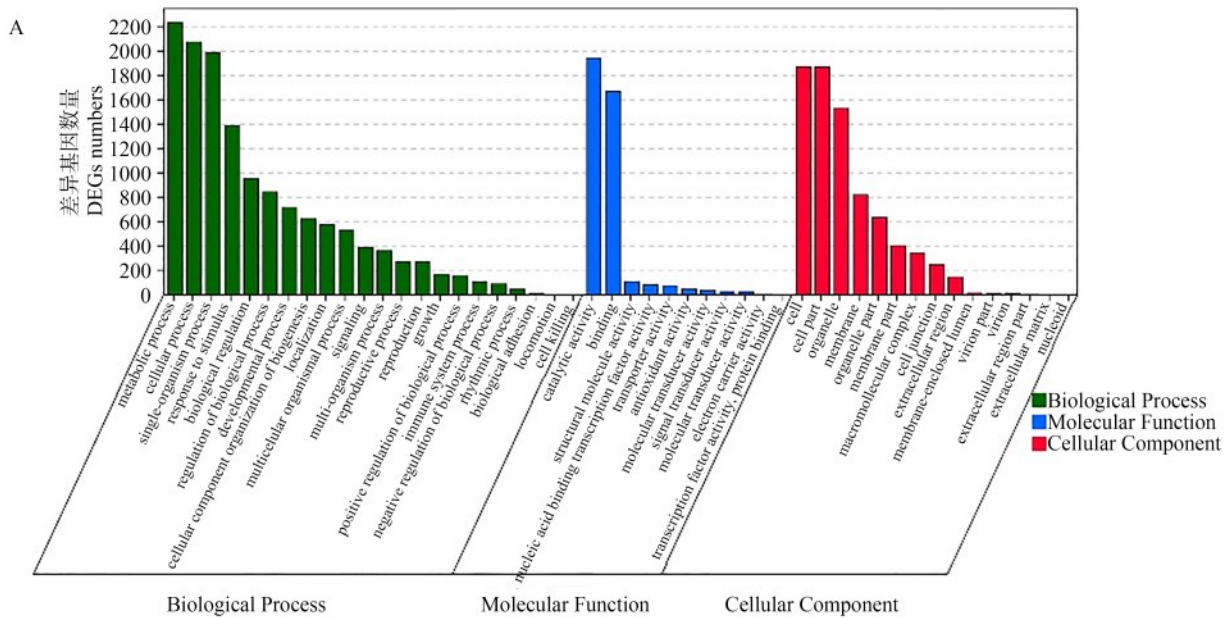


A: 不同品种和发育时期DEGs表达韦恩图,数字表示差异表达基因数量; B: 差异表达基因表达模式

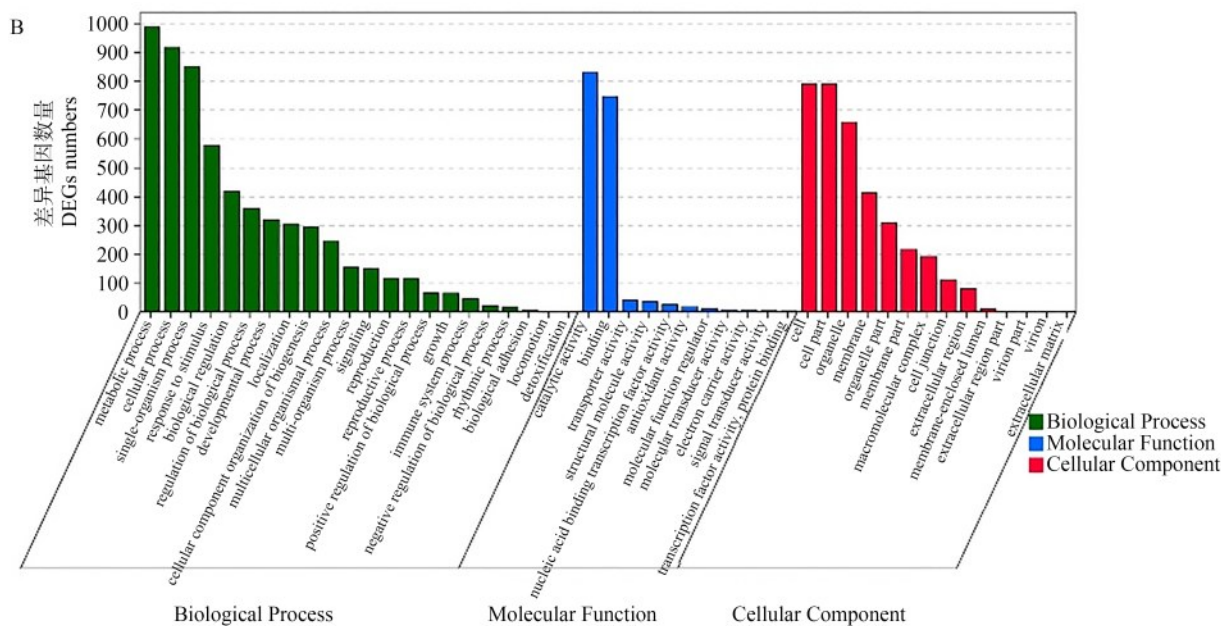
A: Venn diagram of DEGs among different combinations of samples and stages, the number represents the number of DEGs; B: Expression pattern of DEGs

图4 韦恩图及DEGs表达模式

Fig.4 Venn diagram and Expression pattern of DEGs



A: Bar chart showing the number of DEGs across various GO terms, categorized into Biological Process, Molecular Function, and Cellular Component.

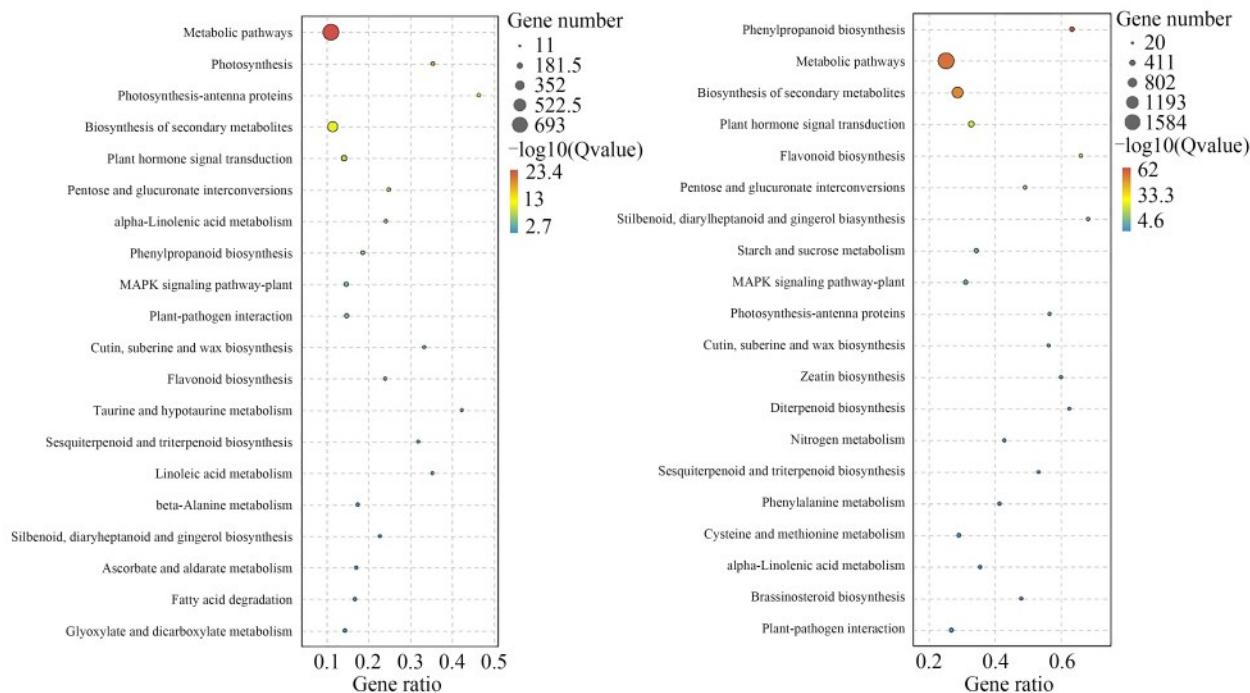


A: 同一品种不同发育时期的 DEGs; B: 相同时期不同品种的 DEGs

A: DEGs of the same variety at different developmental stages; B: DEGs of different varieties in the same period

图5 不同品种和果实发育时期 DEGs 的 GO 富集

Fig.5 GO enrichment of DEGs among different combinations of samples and stages



A: 相同时期不同品种的 DEGs; B: 相同品种在不同发育时期的 DEGs

A: DEGs of different varieties in the same period; B: DEGs of the same variety in different developmental stages

图6 不同品种和果实发育时期 DEGs 的 KEGG 富集

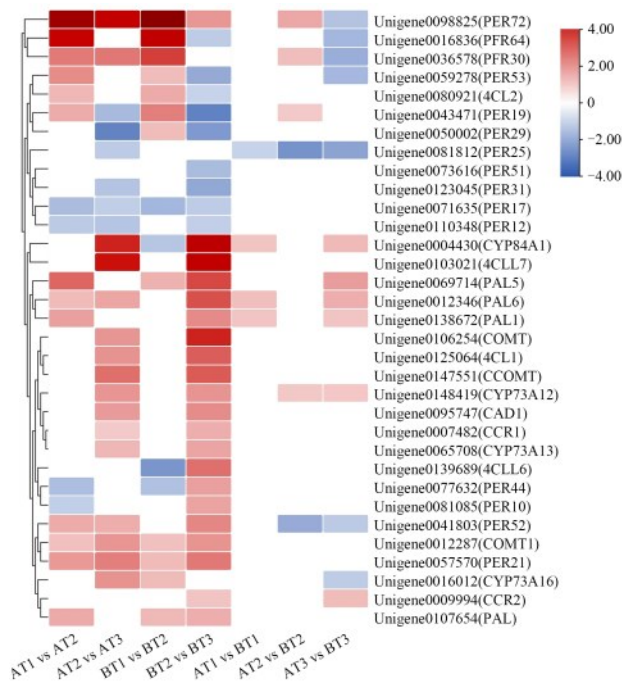
Fig.6 KEGG enrichment of DEGs among different combinations of samples and stages

2.5 与木质素合成相关的差异表达基因分析

对果实发育过程与木质素合成相关的 DEGs 进行筛选,在苏优葵 3 号中共筛选到 30 个 DEGs,在 Z06 中共筛选到 32 个 DEGs。对这些 DEGs 进行聚

类分析,结果发现,在苏优葵 3 号中,开花后 7 d 较开花后 5 d, *PAL6*、*CAD1*、*CYP84A*、*CCR1*、3 个 *COMT*、3 个 *CYP73A*、2 个 *4CL* 显著上调表达;其中,4 个 *PER* 基因显著上调表达,6 个 *PER* 基因显著下调表达。

开花后 5 d 相较于开花后 3 d, 7 个过氧化物酶(*PER*, peroxidase)基因显著上调表达, 4 个 *PER* 基因显著下调表达。在 Z06 中, 开花后 7 d 相较于开花后 5 d, 共有 21 个基因显著上调表达(包括 *PAL*、*CAD*、*CCR*、*COMT*、*CYP73A*、*CYP84A* 和部分 *4CL*、*PER* 基因); 其中, 3 个 *4CL* 基因显著上调表达, 4 *CL2* 显著下调表达; 5 个 *PER* 基因显著上调表达, 8 个 *PER* 基因显著下调表达。开花后 5 d 相较于开花后 3 d, 7 个 *PER* 基因显著上调表达, 2 个 *PER* 基因显著下调表达(图 7)。



红色为显著上调, 蓝色为显著下调, 白色没有显著差异
Red is significant up-regulated expression, blue is significantly down-regulated expression, and white is not significantly different

图 7 与木质素合成相关的差异表达基因在不同品种和发育时期的表达分析

Fig.7 Analysis of differential genes related to lignin synthesis among different combinations of samples and stages

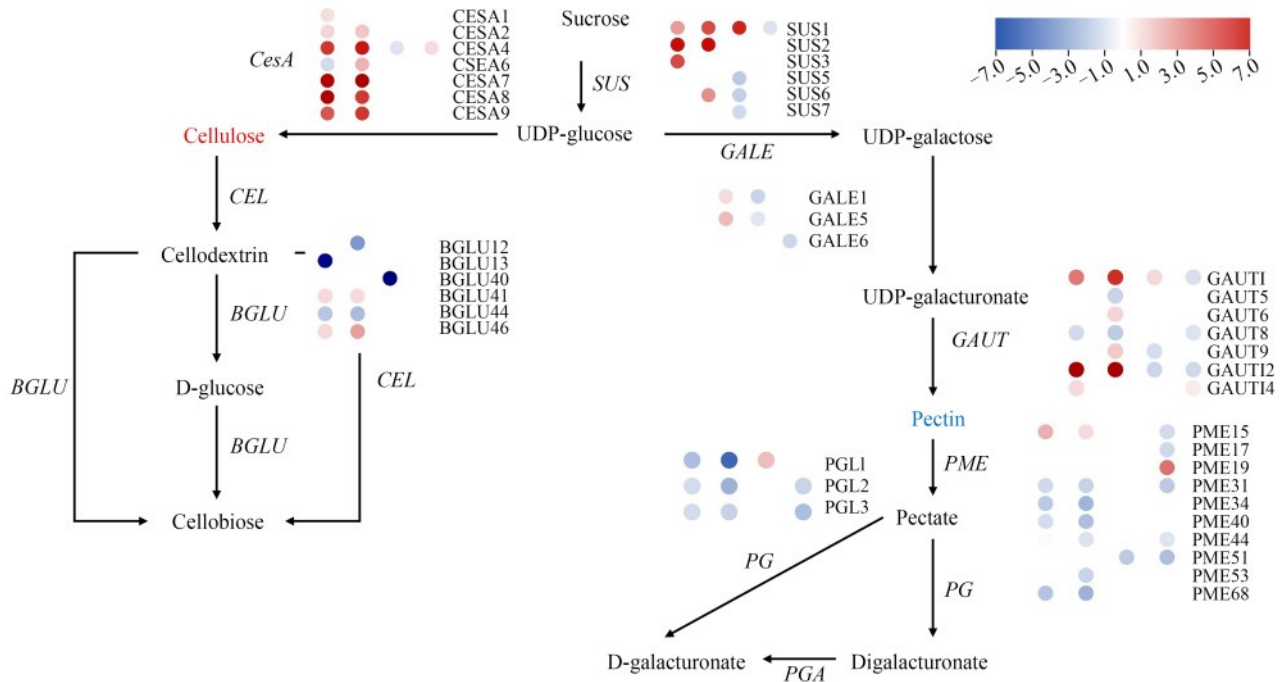
相同时期不同品种相比较而言, 木质素合成相关 DEGs 在不同时期差异较大, 开花后 3 d, 两品种间共有 4 个差异表达的基因, Z06 较苏优葵 3 号显著上调表达的基因有 *CYP84A1*、*PAL6* 和 *PAL1*, 仅 *PER25* 显著下调表达; 开花后 5 d, 共有 6 个差异表达的基因, Z06 较苏优葵 3 号显著上调表达的基因有 4 个(*PER30*、*PER19*、*PER72*、*CYP73A12*), 显著下调表达的基因有 2 个(*PER52*、*PER25*); 开花后 7 d, 两品种间的 DEGs 数最多, 共有 13 个, Z06 较苏优葵 3 号

显著下调的基因包括 6 个 *PER* 基因(*PER64*、*PER30*、*PER52*、*PER53*、*PER25*、*PER72*) 和 1 个 *CYP73A16*, 显著上调表达的 6 个基因分别为 *CYP84A1*、*CCR2*、*PAL6*、*PAL5*、*PAL1*、*CYP73A12*。

2.6 与纤维素和果胶合成代谢相关的差异表达基因分析

由于开花后 3 d, 未筛选到纤维素和果胶合成代谢相关的 DEGs, 所以对开花后 5 d 和 7 d 重点分析。结果发现, 开花后 7 d 较开花后 5 d, 两品种各有 6 个纤维素合成酶基因(*CesA*, cellulose synthase)显著上调表达; 开花后 5 d, Z06 相较于苏优葵 3 号, *CesA4* 基因显著下调表达, 但在开花后 7 d 上调表达。*BGLU* 作为纤维素酶家族, 开花后 7 d 较开花后 5 d, 两品种各有 2 个基因显著下调表达, 同时分别各有 2 个基因显著上调表达; 两品种相较而言, 开花后 5 d 有 1 个 *BGLU* 显著下调表达。*SUS* 在纤维素合成过程起重要作用, 开花后 7 d 较开花后 5 d, 两品种各有 3 个 *SUS* 基因显著上调表达; 而在开花后 5 d, Z06 相较于苏优葵 3 号, 仅 *SUS1* 显著上调表达, *SUS5*、*SUS6*、*SUS7* 均显著下调表达; 在开花后 7 d, 仅 *SUS1* 显著下调表达(图 8)。

开花后 7 d 较开花后 5 d, 参与果胶合成的 *GAUT1*、*GAUT12*、*GAUT14* 在苏优葵 3 号中表达量显著升高, *GAUT1*、*GAUT6*、*GAUT9*、*GAUT12* 在 Z06 中表达量显著升高, 而 *GAUT8* 基因在苏优葵 3 号中下调表达, *GAUT5* 和 *GAUT8* 在 Z06 中下调表达; 在开花后 5 d 和开花后 7 d, Z06 相对于苏优葵 3 号各有 1 个显著上调表达的 *GAUT* 基因, 而开花后 5 d, Z06 相较于苏优葵 3 号有 2 个下调 *GAUT* 基因, 在开花后 7 d 有 3 个下调 *GAUT* 基因。开花后 7 d 较开花后 5 d, 2 个 UDP 阿拉伯糖 4-差异构酶(*GALE*, UDP-glc 4-epimerase)基因在 Z06 中显著上调表达; 两品种相较而言, 差异表达的 *GALE* 基因均下调表达。在果胶代谢过程, 开花后 7 d 较开花后 5 d, *PME15* 在苏优葵 3 号和 Z06 中均显著上调表达, 但 4 个 *PME* 基因在苏优葵 3 号中显著下调表达, 6 个 *PME* 基因在 Z06 中显著下调表达; 在开花后 5 d, Z06 相较于苏优葵 3 号, *PME51* 显著下调表达, 而在开花后 7 d, 除 *PME19* 显著上调表达外, 5 个 *PME* 基因显著下调表达。两品种在开花后 7 d 有 3 个 *PG* 均显著下调表达; 而在开花后 5 d, Z06 相较于苏优葵 3 号, *PG1* 上调表达, 在开花后 7 d, *PG2*、*PG3* 下调表达(图 8)。



基因表达自左往右的4列分别代表AT2 vs AT3、BT2 vs BT3、AT2 vs BT2和AT3 vsBT3。彩色圆形符号表示该基因在此比较组显著差异表达，白色表示没有显著差异。*GALE*的3个比较组分别为BT2 vs BT3、AT2 vs BT2和AT3 vsBT3

The four columns of gene expression represent AT2 vs AT3, BT2 vs BT3, AT2 vs BT2 and AT3 vsBT3. Colored circle symbol indicates that the gene is significantly different expressed in this comparison group, and white is not significantly different. The three comparison groups of *GALE* are BT2 vs BT3, AT2 vs BT2 and AT3 vs BT3

图8 与纤维素和果胶合成代谢相关的DEGs在不同品种和发育时期的表达分析

Fig.8 Expression analysis of DEGs associated with cellulose and pectin anabolism among different combinations of samples and stages

2.7 与光合作用和天线蛋白相关的差异表达基因分析

对相同时期两品种与光合作用相关的DEGs表达情况进行分析,在开花后3 d,两品种间有22个与光合途径相关的DEGs,有9个与光合天线蛋白途径相关的DEGs,且这些基因在Z06中均上调表达(表3)。在Z06中,开花后5 d 6个光合途径相关基因显著上调,有5个基因显著下调;4个与光合天线蛋白途径相关的DEGs均显著上调。在开花后7 d,仅有 *psbB* 1个差异表达基因显著上调表达。

2.8 差异表达基因荧光定量PCR验证

为了测试转录组数据的可靠性,分别选择果实发育过程中显著上调和下调的基因各5个进行qRT-PCR(图9)。结果表明,基于qRT-PCR数据中10个基因的相对表达趋势与转录组测序结果一致。表明转录组的结果是高度可靠的。

2.9 果实质地变硬的关键因素分析

冗余分析(RDA, redundancy analysis)可揭示多

种因素对目标的影响。为了明确细胞壁组分对质地硬化的贡献度,通过RDA分析了5种细胞壁组分与硬度的关系,结果表明,木质素对果实硬度的贡献最大,其次为原果胶和纤维素,半纤维素对果实硬度的贡献较小,可溶性果胶对果实硬度的贡献最低(图10)。随后,通过RDA分析了影响木质素、纤维素和原果胶积累的关键基因。*PAL*对木质素的积累影响最大,其次为*CCR1*、*4CL1*和*CAD1*,*PER31*、*PER51*对木质素的积累呈负贡献。*SUS3*基因对纤维素的积累贡献最大,其次为*SUS1*、*SUS2*和*CesA4*、*CesA9*、*CesA2*及大部分*BGLU*基因对纤维素的积累有负贡献。*GAUT6*、*SUS6*、*SUS2*和*GAUT14*对原果胶的积累贡献较大,但大部分*PME*基因和*PG*基因对原果胶的积累呈负贡献(图10)。与光合作用相关的DEGs大部分与果实硬度成正相关,其中*PSBP2*和*CAB1R*对硬度的贡献较高,*psaA*等5个基因对果实硬度呈负贡献。RDA分析结果与前述中基因表达模式一致,证明了结果的可靠性。

表3 两品种与光合作用和天线蛋白相关的DEGs分析

Table 3 Analysis of DEGs related to photosynthesis and antenna proteins in two cultivars

代谢途径 Metabolic pathway	基因名称 Gene name	log ₂ FC (AT1 vs BT1)	log ₂ FC (AT2 vs BT2)	log ₂ FC (AT3 vs BT3)	基因描述 Description
光合作用 Photosynthesis	<i>atpF</i>	—	1.03	—	ATP合成酶CF0亚基
	<i>atpB</i>	1.06	-2.20	—	ATP合成酶CF1β亚基
	<i>ATPC</i>	1.76	—	—	ATP合酶γ链
	<i>petC</i>	1.02	—	—	细胞色素 b6-f 复合铁硫亚基
	<i>AP1</i>	1.63	—	—	铁氧化还原蛋白
	<i>PSBO</i>	1.61	—	—	放氧增强蛋白1
	<i>PSBP2</i>	2.00	1.29	—	放氧增强蛋白2
	<i>psaA</i>	—	-2.75	—	光系统I P700 载脂蛋白A1
	<i>psaD</i>	1.54	—	—	光系统I反应中心亚基II
	<i>PSAF</i>	1.63	1.01	—	光系统I反应中心亚基III
	<i>PSAK</i>	1.42	—	—	光系统I反应中心亚基psaK
	<i>PSAG</i>	1.55	1.05	—	光系统I反应中心亚基V
	<i>PSAH</i>	1.35	—	—	光系统I反应中心亚基VI
	<i>PSAL</i>	1.33	—	—	光系统I反应中心亚基XI
	<i>PSAO</i>	1.64	—	—	光系统I亚基O
	<i>PSBY</i>	1.41	—	—	光系统II核心复合蛋白
	<i>psbK</i>	1.08	-1.86	—	光系统II蛋白I
	<i>psbZ</i>	1.22	-2.19	—	光系统II蛋白z
	<i>PSBW</i>	1.36	—	—	光系统II反应中心W蛋白
	<i>PSB27</i>	1.32	1.24	—	光系统II修复蛋白
<i>psbB</i>	—	-1.90	1.19	光系统II反应中心蛋白CP47	
<i>PSBQ</i>	1.43	—	—	放氧增强蛋白3	
<i>PSAEA</i>	1.39	1.79	—	光系统I反应中心亚基IV	
<i>PSBS</i>	1.08	—	—	光系统II22kDa蛋白	
<i>PSBR</i>	1.38	—	—	丙酮酸脱羧酶1样	
光合天线蛋白 Photosynthesis antenna proteins	<i>CAB-151</i>	1.36	1.04	—	CAB151蛋白
	<i>CAB1R</i>	1.82	1.47	—	叶绿素 a-b 结合蛋白2
	<i>LHCA3</i>	1.35	—	—	叶绿素 a-b 结合蛋白3
	<i>CAB6A</i>	1.45	—	—	叶绿素 a-b 结合蛋白6A
	<i>LHCA6</i>	1.50	—	—	叶绿素 a-b 结合蛋白7
	<i>CAP10A</i>	1.74	1.35	—	叶绿素 a-b 结合蛋白CP24 10A
	<i>LHCB5</i>	1.43	—	—	叶绿素 a-b 结合蛋白CP26
	<i>LHCB4.1</i>	1.52	—	—	叶绿素 a-b 结合蛋白CP29.2
	<i>LHCA4</i>	1.67	1.03	—	叶绿素 a-b 结合蛋白4

表中正值为比较组后者较前者上调表达,负值为下调表达,—表示没有显著差异

The positive value is up-regulated expression of the latter in the comparison group, the negative value is down-regulated expression of the latter in the comparison group, and — indicates no significant difference

3 讨论

RNA-seq是探究植物发育分子机制的重要技术手段,广泛应用于产品器官质地变化的机理研究^[18]。本研究对果实成熟阶段质地变化进程显著不同的两个黄秋葵品种进行转录组测序,结果发现,随黄秋葵果实质地变硬,差异表达基因主要在苯丙烷生物合成途径富集。赵亚梅等^[19]在桃树上有相似的发现,苯丙烷生物合成途径参与木质素生物合成,这与木质素对黄秋葵果实硬度贡献最大一致(图10),表明木质素积累是黄秋葵果实质地变硬最关键的因素。两品种质地的差异,除了与苯丙烷

生物合成途径有关,光合作用和光合天线蛋白途径的差异表达基因也起到关键作用,大部分光合作用相关的基因与黄秋葵果实硬度呈正相关(图10),因为光合作用作为碳源积累的关键过程为纤维素、木质素、果胶等生物合成提供基础。Chen等^[20]同样发现,光合作用对棉花的最终产量和纤维有很大贡献。本研究中,*PSBP2*和*CAB1R*对硬度的贡献较高。Ifuku等^[21]研究发现*PsbP*对PSII的调节和稳定性至关重要,而*CAB*作为叶绿素结合蛋白,在桃果实成熟软化阶段迅速下调表达^[22],进一步揭示了*PSBP2*和*CAB1R*是影响黄秋葵两品种果实质地差异的重要基因。

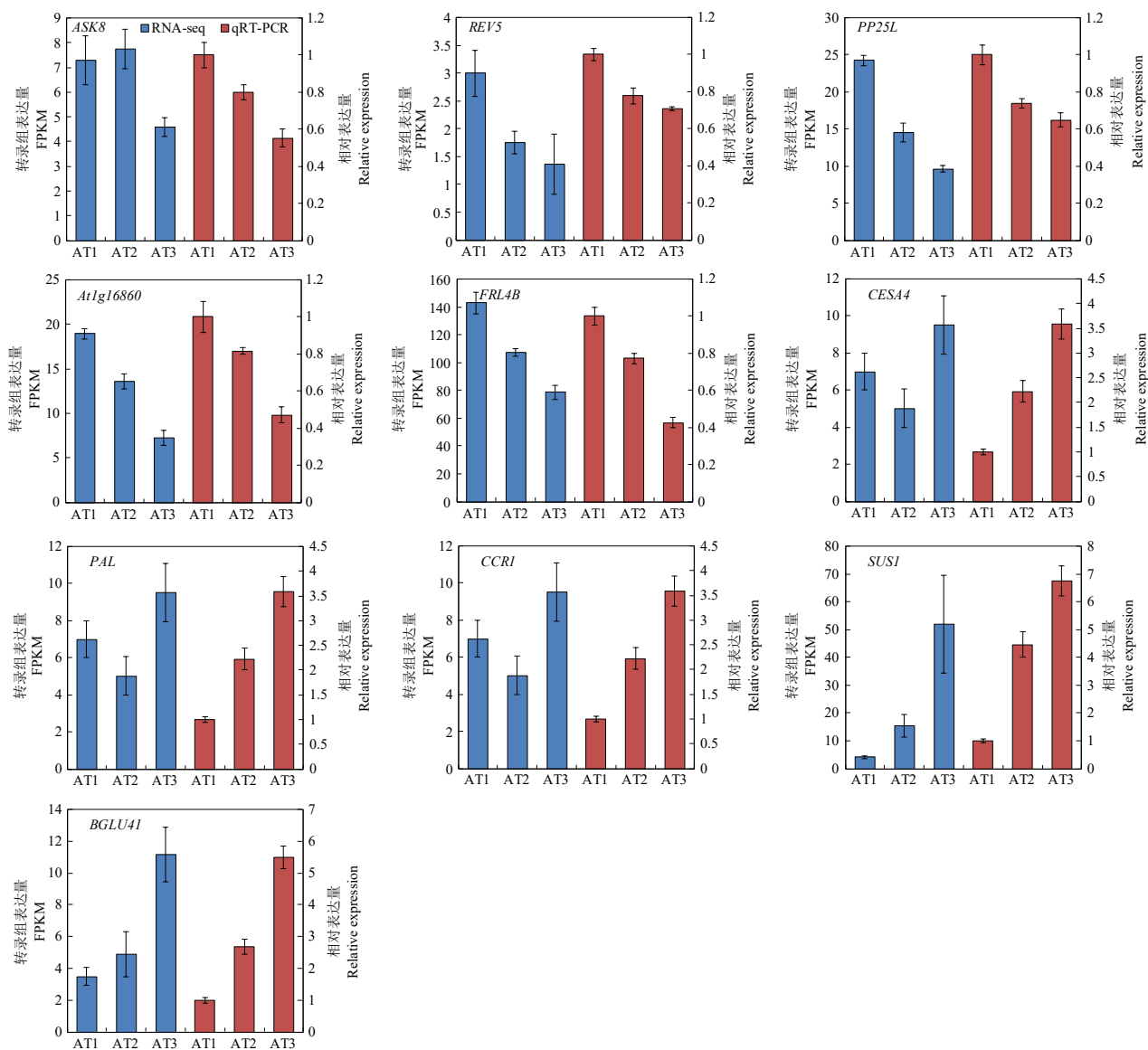


图9 差异表达基因的qRT-PCR验证

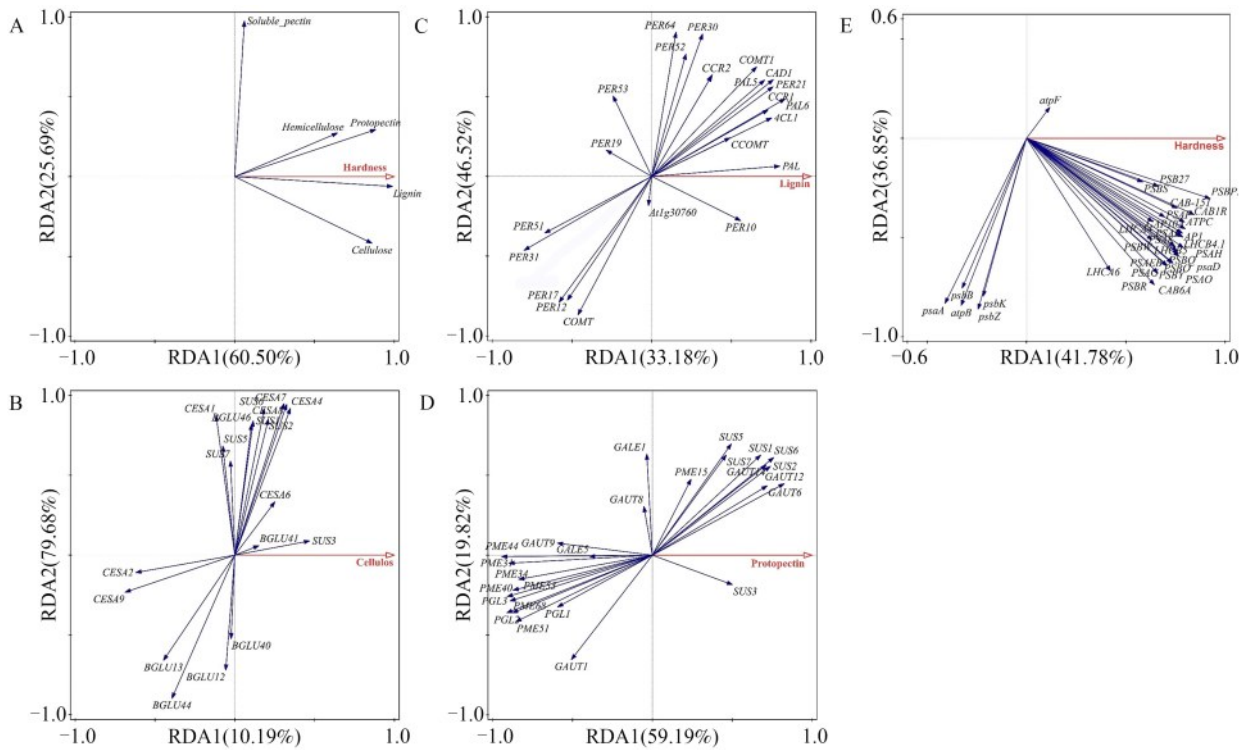
Fig.9 qRT-PCR validation of differentially expressed genes

细胞壁结构是影响果实质地的重要因素^[23]。木质素作为细胞壁的重要组分,是影响黄秋葵果实质地变硬的主要原因。类似的研究表明,木质素积累会增加桃果实的硬度^[19],但降低愈伤组织弹性^[24]。PAL是木质素生物合成途径的限速酶,其表达及活性与木质素含量密切相关^[25]。Lu等^[26]研究表明,过表达*RcPLA*基因可显著提高蓖麻木质素的含量。本研究中,*PAL*对木质素合成的贡献最高,筛选的所有*PAL*基因均随黄秋葵果实老化显著上调表达,且Z06的*PAL*表达显著高于苏优葵3号,表明*PAL*是调控黄秋葵果实木质素积累的关键因子。此外,*CCR1*、*4CL1*和*CAD1*也对木质素的积累有较大贡献。*CCR*是木质素生物合成单信号通路中的第一个固定酶^[27],且*CCR*的表达与木质素含量呈显著

正相关^[28]。本研究中,Z06差异表达的*CCR*基因随果实发育均显著上调表达,且*CCR2*基因在Z06中的表达高于苏优葵3号,表明*CCR*对黄秋葵果实木质素的积累起重要作用。相似的研究表明,*CCR2*基因的敲除会导致杨树木质素的显著降低^[29]。*4CL*是催化单信号醇生物合成途径中的一个关键步骤,对木质素沉积具有重要作用^[30],本研究中两品种的*4CL1*在开花后7d表达量最高,从而促进黄秋葵果实发育后期木质素的积累。过表达*AaCAD*可显著提高青蒿中木质素的含量^[31],这也与本研究中*CAD1*对木质素的贡献一致。本研究中共筛选到15个差异表达的*PER*基因,而仅有*PER21*对木质素的贡献最高,大部分*PER*基因对木质素的积累为负贡献,

这可能因为 *PER* 为大基因家族, 存在功能冗余, 且仅有部分 *PER* 对木质素的合成起作用^[32], 因此, 本

研究筛选的 *PER21* 基因对木质素的合成促进作用有待进一步研究。



A: 果实硬度与细胞壁组分相关性; B: 纤维素与纤维素合成代谢相关基因相关性; C: 木质素与木质素合成代谢相关基因相关性; D: 原果胶与果胶合成代谢相关基因相关性; E: 硬度与光合相关基因相关性; 横纵坐标分别表示在整体解释量中的重要性

The correlation between A: Fruit Hardness and cell wall components; B: Cellulose and cellulose synthetic metabolic related genes; C: Lignin and lignin synthetic metabolism related genes; D: Protopectin and pectin synthesis metabolism related genes; E: Hardness and photosynthesis related genes. The horizontal and vertical coordinates represent the importance in the overall interpretation volume

图 10 RDA 分析影响质地的关键因素

Fig.10 RDA analysis of key factors affecting texture

本研究中, 纤维素对果实硬度也呈正贡献。李永平等^[33]同样发现, 纤维素在黄秋葵果实老化过程起重要作用。本研究发现, *SUS3* 对纤维素的合成贡献最高, Fujii 等^[34]同样研究表明, 除 *CesA* 外, *SUS* 是纤维素合成催化单元的重要部分, 且 Coleman 等^[35]在杨树中过表达 *SUS* 基因, 显著提高了木质部纤维素含量, 证明了 *SUS* 与纤维素合成及次生细胞壁形成密切相关。CesA 是纤维素合成的重要催化步骤^[36], 本研究中, *CesA4*、*CesA6*、*CesA7*、*CesA8* 对纤维素合成呈正贡献, 表明 *CesA* 的上调表达也是纤维素积累重要原因。*BGLU* 在纤维素代谢过程起重要作用^[37]。本研究中, 除 *BGLU41* 外, 其他 *BGLU* 基因均对纤维素呈负贡献, 表明 *BGLU* 基因的下调表达是黄秋葵果实中纤维素积累的重要原因。

果胶可在局部水平上控制水的性质, 从而影响分子相互作用, 赋予细胞壁机械性能^[38], 且 Koziol 等^[39]研究表明果胶是细胞壁力学性能的决定因素。原果

胶的降解, 会使果肉细胞分离导致硬度下降^[3]。本研究中, 原果胶对果实硬度的贡献度与纤维素类似, 且 Z06 的原果胶含量显著高于苏优葵 3 号, 表明原果胶作为连接细胞壁各组分的重要物质, 对黄秋葵果实硬度有重要作用。类似的研究发现, 较高的原果胶、纤维素含量可维持细胞壁的完整性, 从而保证无花果的硬度, 但可溶性果胶含量较低^[4]。本研究中, *GAUT6* 对原果胶的贡献最高, 其次为 *SUS6* 和 *SUS2*, Biswal 等^[40]同样研究发现, *GAUT* 的沉默表达导致杨树中果胶含量的降低, 表明 *GAUT6* 是影响黄秋葵果实果胶积累的关键基因; 但 *SUS* 对果胶的调控作用报道较少, 本研究中 *SUS* 对果胶生物合成的调控机制有待进一步研究。PG 和 PME 是促进果胶降解重要的代谢酶, 本研究中, 大部分 *PME* 和 *PG* 对原果胶的积累均呈负贡献, 表明 *PG* 和 *PME* 表达水平的降低也是果胶积累的重要原因。Gwanpua 等^[41]同样研究发现, *MdPG* 的表达水平与苹果硬度呈显著负相关。

4 结论

综上所述,与黄秋葵果实发育和质地变硬有关的差异表达基因主要富集于苯丙烷生物合成途径;而两个品种质地的差异除了与苯丙烷生物合成途径有关,光合作用及光合天线蛋白途径的差异表达基因也起到关键作用。*PSBP2*和*CABIR*是光合途径中影响两品种质地差异的关键基因。木质素的积累对黄秋葵果实质地变硬起主要作用,*PAL*是调控木质素积累的主要基因,显著影响不同发育时期两个品种木质素的合成,而*PAL*、*CCR2*、*CYP84A1*、*CYP73A12*是影响品种质地差异的重要基因。纤维素和原果胶对黄秋葵果实变硬也具有积极的贡献。*SUS3*对黄秋葵果实纤维素积累贡献最大,且*SUS*和*CesA*显著影响了果实发育过程纤维素的积累。*GAUT6*是调控黄秋葵果实原果胶积累的重要基因,且*PG*和*PME*的下调表达是果实发育过程果胶积累的重要原因;此外*SUS6*和*SUS2*对原果胶的积累也具有较大贡献,但其对果胶合成的调控机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Singh P, Chauhan V, Tiwari B K, Chauhan S S, Simon S, Bilal S, Abidi A. An overview on okra (*Abelmoschus esculentus*) and its importance as a nutritive vegetable in the world. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2014, 4:227-233
- [2] 黄伟男. 枇杷果实采后细胞木质素积累与细胞壁果胶动力学机制研究. 杭州: 浙江大学, 2021
Huang W N. Mechanism study on the lignin accumulation in lignified cells and cell-wall dynamic of pectin in postharvest loquat fruit. Hangzhou: Zhejiang University, 2021
- [3] Goulao L F, Oliveira C M. Cell wall modifications during fruit ripening: When a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19:4-25
- [4] Ren Y Y, Huang D D, Liu S W, Zhao F Y, Yu K, Zhu S H. Sodium hydrosulfide delays the softening of fig fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 2022, 299: 111037
- [5] Wang D D, Yeats T H, Uluisik S, Rose J K C, Seymour G B. Fruit softening: Revisiting the role of pectin. *Trends in Plant Science*, 2018, 23:302-310
- [6] 刘剑锋, 程云清, 彭抒昂. 梨采后细胞壁成分及果胶酶活性与果肉质地的关系. *园艺学报*, 2004, 31 (5):579-583
Liu J F, Cheng Y Q, Peng S A. The relationship between changes of cell wall components, ectin-degradingenzyme activity and texture of postharvest pear fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31 (5): 579-583
- [7] Yu W, Li S, Zheng B, Wang Y, Yu Y, Wang Y, Zheng X, Liu J, Zhang Z, Xue Z. Transcriptome analysis reveals the potential mechanism of polyethylene packing delaying lignification of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, 2022, 5: 100117
- [8] Liu W L, Zhang J, Jiao C, Yin X R, Fei Z J, Wu Q B, Chen K S. Transcriptome analysis provides insights into the regulation of metabolic processes during postharvest cold storage of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruit. *Horticulture Research*, 2019, 6: 49
- [9] 刘恋, 唐志鹏, 李菲菲, 熊江, 吕壁纹, 马小川, 唐超兰, 李泽航, 周铁, 盛玲, 卢晓鹏. ‘融安金柑’‘滑皮金柑’及‘脆蜜金柑’贮藏期品质、贮藏特性及果皮转录组分析. *中国农业科学*, 2021, 54 (20):4421-4433
Liu L, Tang Z P, Li F F, Xiong J, Lv B W, Ma X C, Tang C L, Li Z H, Zhou T, Sheng L, Lu X P. Fruit quality in storage, storability and peel transcriptome analysis of Rong’an Kumquat, Huapi Kumquat and Cuimi Kumquat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54 (20): 4421-4433
- [10] Ren J, Wang J R, Gao M Y, Qin L, Wang Y. Decreased cellulose-degrading enzyme activity causes pod hardening of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 162:624-633
- [11] Liu X, Li S, Feng X, Li L. Study on cell wall composition, fruit quality and tissue structure of hardened ‘Suli’ Pears (*Pyrus bretschneideri* Rehd). *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 40: 2007-2016
- [12] Wang Y, Zhang X F, Yang S L, Yuan Y B. Lignin involvement in programmed changes in peach-fruit texture indicated by metabolite and transcriptome analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66:12627-12640
- [13] Defilippi B G, Ejsmentewicz T, Covarrubias M P, Gudenschwager O, Campos-Vargas R. Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of “Hass” avocados (*Persea americana* Mill.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 128:142-151
- [14] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006
Wang X K. Plant physiological and biochemical experiment principle and technology. Beijing: Higher Education Press, 2006
- [15] 熊素敏, 左秀凤, 朱永义. 稻壳中纤维素, 半纤维素和木质素的测定. *粮食与饲料工业*, 2005(8): 40-41
Xiong S M, Zuo X F, Zhu Y Y. Determination of cellulose, hemicellulose and lignin in rice hull. *Cereal Feed Industry*, 2005(8): 40-41
- [16] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社, 2007
Cao J K, Jiang W B, Zhao Y M. Guidance for postharvest physiological and biochemical experiments of fruits and vegetables. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [17] Li F W, Nishiyama T, Waller M, Frangedakis E, Keller J, Li Z, Szövényi P. Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature Plants*, 2020, 6(3): 259-272
- [18] Gao Y, Guo Y, Su Z Y, Yu Y, Zhu Z C, Gao P, Wang X Z.

- Transcriptome analysis of genes related to fruit texture in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109075
- [19] 赵亚梅, 陈生煜, 游乐, 韩茹, 翟俊文, 任惠, 吴沙沙. 阳桃木质素生物合成相关基因的筛选与分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23 (2): 527-540
- Zhao Y M, Chen S Y, You L, Han R, Zhai J W, Ren H, Wu S S. Identification and analysis lignin biosynthesis genes of *Averrhoa carambola*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23 (2): 527-540
- [20] Chen B L, Yang H K, Ma Y N, Liu J R, Lv F J, Chen J, Meng Y L, Wang Y H, Zhou Z G. Effect of shading on yield, fiber quality and physiological characteristics of cotton subtending leaves on different fruiting positions. *Photosynthetica*, 2017, 55: 240-250
- [21] Ifuku K, Yamamoto Y, Ono T, Ishihara S, Sato F. PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1175-1184
- [22] Wang Y, Zhang X F, Yang S L, Yuan Y B. Lignin involvement in programmed changes in peach-fruit texture indicated by metabolite and transcriptome analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66: 12627-12640
- [23] Cybulska J, Zdunek A, Psonka-Antonczyk K M, Stokke B T. The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 128-137
- [24] Wang B, Li Z C, Han Z H, Xue S L, Bi Y, Prusky D. Effects of nitric oxide treatment on lignin biosynthesis and texture properties at wound sites of muskmelons. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130193
- [25] Begovic L, Abicic I, Lalic A, Lepedus H, Cesar V, Leljalk-Levanic D. Lignin synthesis and accumulation in barley cultivars differing in their resistance to lodging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 133: 142-148
- [26] Lu J N, Shi Y Z, Li W J, Chen S, Wang Y F, He X L, Yin X G. RcPAL, a key gene in lignin biosynthesis in *Ricinus communis* L. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 1-11
- [27] Park H L, Bhoo S H, Kwon M, Lee S W, Cho M H. Biochemical and expression analyses of the rice Cinnamoyl-CoA reductase gene family. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2099
- [28] Chanoca A, de Vries L, Boerjan W. Lignin engineering in forest trees. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 912
- [29] De Meester B, Calderon B M, de Vries L, Pollier J, Goeminne G, Van Doorslaere J, Chen M J, Ralph J, Vanholme R, Boerjan W. Tailoring poplar lignin without yield penalty by combining a null and haploinsufficient CINNAMOYL-CoA REDUCTASE2 allele. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-13
- [30] Gui J S, Luo F, Zhong Y, Sun J Y, Umezawa T, Li L G. Phosphorylation of LTF1, an MYB transcription factor in populus, acts as a sensory switch regulating lignin biosynthesis in wood cells. *Molecular Plant*, 2019, 12: 1325-1337
- [31] Ma D M, Xu C, Alejos-Gonzalez F, Wang H, Yang J F, Judd R, Xie D Y. Overexpression of *artemisia annua* cinnamyl alcohol dehydrogenase increases lignin and coumarin and reduces artemisinin and other sesquiterpenes. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 828
- [32] Marjamaa K, Kukkola E M, Fagerstedt K V. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60: 367-376
- [33] 李永平, 陈敏敏, 刘建汀, 曾美娟, 朱海生, 温庆放. 黄秋葵纤维素合酶基因家族鉴定及表达分析. *园艺学报*, 2022, 49 (1): 73-85
- Li Y P, Chen M D, Liu J D, Zeng M J, Zhu H S, Wen Q F. Identification and expression analysis of CESA gene family in *Hibiscus esculentus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49 (1): 73-85
- [34] Fujii S, Hayashi T, Mizuno K. Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51: 294-301
- [35] Coleman H D, Yan J, Mansfield S D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106: 13118-13123
- [36] Nawaz M A, Lin X, Chan T F, Imtiaz M, Rehman H M, Ali M A, Baloch F S, Atif R M, Yang S H, Chung G. Characterization of cellulose synthase A (CESA) gene family in eudicots. *Biochemical Genetics*, 2019, 57: 248-272
- [37] Xiao Y, Yi F, Ling J J, Wang Z, Zhao K, Lu N, Qu G Z, Kong L S, Ma W J, Wang J H. Transcriptomics and proteomics reveal the cellulose and pectin metabolic processes in the tension wood (Non-G-Layer) of *Catalpa bungei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 1686
- [38] Lopez-Sanchez P, Martinez-Sanz M, Bonilla M R, Sonni F, Gilbert E P, Gidley M J. Nanostructure and poroviscoelasticity in cell wall materials from onion, carrot and apple: Roles of pectin. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105253
- [39] Koziol A, Cybulska J, Pieczywek P M, Zdunek A. Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 161: 197-207
- [40] Biswal A K, Hao Z Y, Pattathil S, Yang X H, Winkler K, Collins C, Mohanty S S, Richardson E A, Gelineo-Albersheim I, Hunt K, Ryno D, Sykes R W, Turner G B, Ziebell A, Gjersing E, Lukowitz W G, Davis M F, Decker S R, Hahn M G, Mohnen D. Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 1-26
- [41] Gwanpua S G, Mellidou I, Boeckx J, Kyomugasho C, Bessemans N, Verlinden B E, Hertog M, Hendrickx M, Nicolai B M, Geeraerd A H. Expression analysis of candidate cell wall-related genes associated with changes in pectin biochemistry during postharvest apple softening. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 112: 176-185