

基于RNA-seq番石榴果实软化候选基因的挖掘及表达分析

范兢升¹, 马松琼¹, 宁琳¹, 何江¹, 陈念², 欧景莉¹, 陈豪军¹, 陈丹³

¹广西壮族自治区亚热带作物研究所/广西亚热带特色水果质量安全控制重点实验室, 南宁 530001;

²南宁市农业科学研究所, 南宁 530021; ³广西农业职业技术大学农业工程学院, 南宁 530007)

摘要: 番石榴变种丰富, 不同品种的果实质地差异较大。果实的软化程度决定了其食用口感、运输贮藏及货架期等商品价值。为探究影响番石榴果实质地软化的调控基因, 本研究比较了酥脆品种粉红蜜与软肉品种西瓜2号果实于坚熟期与软熟期的转录组。结果表明, 软熟期品种间差异表达基因数目最多, GO注释显示差异基因主要富集在结合活性和催化活性等分子功能中, KEGG代谢通路分析显示差异基因主要富集在光合作用、光合作用天线蛋白、半乳糖代谢和植物激素信号转导途径。两个品种在软熟期果实质地的差异与细胞壁代谢途径、木质素生物合成途径、植物激素代谢基因和转录因子的调控密切相关。J3R85008159_PG和J3R85010291_XTH的上调表达是促进番石榴软化的重要因素。J3R85010291_TCH4可能通过降低细胞壁的机械强度调控果实软化。木质素合成途径基因(J3R8506005_CAD、J3R8502863_POD、J3R8507303_POD、J3R8500836_LAC和J3R8507803_LAC)的下调表达延缓木质素的积累, 促进果实软化。ABA途径调控基因(PYL和SnRK2)、乙烯途径调控基因(ETR/ERS、EBF1/2、EIN3)和相关转录因子家族基因(J3R85017767_MYB、J3R85004770_MYB、J3R85004060_NAC、J3R85006932_NAC、J3R85012461_ERF、J3R85010726_bHLH、J3R85003109_bHLH、J3R85014989_bHLH、J3R85015176_WRKY、J3R85014001_WRKY、J3R85014684_WRKY、J3R85010736_WRKY)可能协同调控细胞壁代谢基因的表达从而影响番石榴软化过程。

关键词: 番石榴; 果实质地; 转录组; 候选基因

Mining and Expression Analysis of Softening Candidate Genes in Guava Fruit Based on RNA-seq

FAN Jingsheng¹, MA Songqiong¹, NING Lin¹, HE Jiang¹, CHEN Nian², OU Jingli¹, CHEN Haojun¹, CHEN Dan³

¹Guangxi Subtropical Crops Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruits,

Nanning 530001; ²Nanning Institute of Agricultural Sciences, Nanning 530021; ³College of Agricultural Engineering,

Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530007)

Abstract: Guava variants are abundant and fruit texture varies considerably between varieties. The softening degree of fruit determines its edible taste, transportation, storage and shelf life and other commodity values. In order to explore the regulatory genes affecting the texture softening of guava fruit, transcriptomic sequencing was performed on two cultivars, Fenhongmi (crisp) and Xigua No.2 (soft) at the firm ripening stage and soft ripening stage. The results showed that the number of differentially expressed genes was the highest among two varieties at soft maturity stage. GO annotation showed that differentially expressed genes were mainly enriched in molecular functions such as binding activity and catalytic activity, and KEGG metabolic pathway analysis showed that differentially expressed genes were mainly enriched in photosynthesis, photosynthetic antenna

收稿日期: 2024-03-10 网络出版日期: 2024-11-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240310001>

第一作者研究方向为果树种质资源研究及遗传育种, E-mail: jingshengfan@yeah.net

通信作者: 陈丹, 研究方向为农业生态, E-mail: ddan55@126.com

基金项目: 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科2023YM123, 桂农科2021YT146)

Foundation project: Basic Scientific Research Projects of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Guinongke2023YM123, Guinongke2021YT146)

protein, galactose metabolism and plant hormone signal transduction pathways. The difference of texture of the two varieties in soft ripening stage is closely related to the regulation of cell wall metabolism, lignin biosynthesis pathway, plant hormone metabolism genes and transcription factors. The up-regulated expression of *J3R85008159_PG* and *J3R85010291_XTH* is an important factor promoting the softening of guava. *J3R85010291_TCH4* may regulate fruit softening by reducing the mechanical strength of cell wall. Down-regulated expression of lignin synthesis pathway genes (*J3R8506005_CAD*, *J3R8502863_POD*, *J3R8507303_POD*, *J3R8500836_LAC* and *J3R8507803_LAC*) delayed lignin accumulation and promoted fruit softening. ABA pathway regulatory genes (*PYL* and *SnRK2*), ethylene pathway regulatory genes (*ETR/ERS*, *EBF1/2*, *EIN3*) and related transcription factor family genes (*J3R85017767_MYB*, *J3R85004770_MYB*, *J3R85004060_NAC*, *J3R85006932_NAC*, *J3R85012461_ERF*, *J3R85010726_bHLH*, *J3R85003109_bHLH*, *J3R85014989_bHLH*, *J3R85015176_WRKY*, *J3R85014001_WRKY*, *J3R85014684_WRKY*, *J3R85010736_WRKY*) may synergistic regulate the expression of cell wall metabolic genes and thus affect the softening process of guava.

Key words: *Psidium guajava* L.; fruit texture; transcriptome; candidate genes

番石榴 (*Psidium guajava* L.) 是桃金娘科 (Myrtaceae) 番石榴属 (*Psidium*) 的常绿小乔木, 染色体数目为 22 条 (2n=22), 基因组大小为 450 Mb^[1]。番石榴在我国台湾、福建、广东、广西和海南等地广泛种植, 果实富含维生素与多酚、黄酮、单宁和萜类等生物活性物质, 是亚热带名优水果之一^[2-3]。目前世界上约有 150 个番石榴栽培品种, 不同品种果实成熟时的外观、颜色、香气和果肉质地存在较大差异, 酥脆番石榴成熟时果肉质地变化不明显, 易于贮存运输, 但果肉较硬, 口感差; 软肉番石榴在成熟时果肉质地明显变软, 风味和口感有所提升, 但易受机械伤害和病菌侵染, 严重影响其商品价值^[4]。因此, 了解番石榴果实成熟软化的分子调控机制, 对番石榴综合品质的改良有重要意义。

细胞壁降解与果实成熟软化密切相关。在果实软化过程中, 细胞壁水解酶作用于纤维素、半纤维素和果胶, 导致细胞壁降解^[5]。多聚半乳糖醛酸酶基因 (*PG*, *polygalacturonase*)、果胶酯酶基因 (*PME*, *pectinesterase*) 和 β -半乳糖苷酶基因 (β -*Gal*, β -*galactosidase*) 调控果胶的降解, 在桃^[6]、葡萄^[7]和甜樱桃^[8]等果实软化过程中发挥着关键的作用。木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 (*XTH*, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase*) 和膨胀素基因 (*EXP*, *expansin*) 调控细胞壁伸展和结构松弛, 起到软化果实的作用^[9-10]。

植物激素是参与果实发育过程的重要物质, 目前已经鉴定了许多调控果实软化的植物激素信号转导基因与转录因子^[11]。乙烯信号转导基因 (*EIN*, *ethylene-insensitive3*) 是激活乙烯信号转导途径中的

重要基因, 沉默番茄 *LeEIN2* 可以延缓果实软化, 降低软化相关基因的表达量^[12]。过表达番茄 ABA 受体基因 *SIPYL9* (*Pyrabactin resistance-like 9*) 可以影响细胞壁代谢途径基因 *SIPG* 和 *SIEXP6* 的表达, 加速果实软化进程^[13]。乙烯响应因子 (*ERF*, *ethylene responsive factor*) 可以调节植物激素的生物合成并参与激素信号传导, *PpERF4* 与桃 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶基因 *PpACO1* (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase*) 和桃生长素基因 *PpIAA1* (*indole-3-acetic acid*) 的启动子结合并激活其转录, *PpIAA1* 与 *PpERF4* 相互作用形成的复合物可以激活果实软化基因 *PpPG1* 的转录, 表明生长素和乙烯通过影响 *PG* 基因从而联合调控果实的成熟软化^[14]。目前, 对于番石榴果实软化的研究主要集中在采后方向^[15-17], 从转录水平上对不同品种番石榴成熟时质地变化相关基因的研究较少。本研究以软熟期果实质地差异显著的两个番石榴品种粉红蜜和西瓜 2 号为试验材料, 对坚熟期和软熟期果实的转录组测序数据进行分析, 发掘影响番石榴果肉质地的关键基因, 为番石榴品质育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料种植于农业农村部南宁番石榴种质资源圃, 选用品种为粉红蜜与西瓜 2 号。粉红蜜果实呈苹果形, 果肉粉红色, 口感脆爽甜, 籽较硬。西瓜 2 号果实呈梨形, 果肉红色, 口感软滑, 风味浓郁, 不耐贮藏。

花期自2023年5月下旬开始,花后约38 d对果实进行套袋,此时幼果横径达3.5 cm。取坚熟期(F, firm ripe stage)与软熟期(S, soft ripe stage)果实进行测定。西瓜2号在套袋46 d达坚熟期,套袋52 d达软熟期。粉红蜜在套袋43 d达坚熟期,套袋50 d达软熟期。每个时期每个品种取3个生物学重复,去除果皮、果囊和种子部分,留取中部3 cm果肉用于后续试验。

1.2 果实质地性状测定

利用美国 Food Technology Corporation 公司 TMS-PRO 质构仪对番石榴果肉质性状进行测定,将果肉切成厚度1 cm的正方体置于物性分析仪平板上,利用直径2 mm的P/2圆柱探头进行测定。参考肖嘉琪^[15]的参数设置:测试模式选择TPA模式,检测速度50 mm/min,压缩程度30%,停留间隔5 s,触发力为10 N。每个单果测定5个点,取平均值,得到果实口感及质地参数:硬度、脆度、黏着性、胶粘性和咀嚼性。硬度与脆度表示果实达到变形时所需的力;黏着性表示在探头与果实接触时用以克服两者表面间吸引力所必需的总功,与探头上附着样品残留物有关;胶粘性表示探头从样品中拉回所必需的力;咀嚼性表示将样品咀嚼成吞咽时的稳定状态所需的能量。

1.3 RNA提取、文库构建与转录组测序

将果实样品干冰条件下送至上海美吉生物公司完成总RNA提取、文库构建与Illumina Novaseq 6000平台转录组测序。构建的4个文库为:XG-F(坚熟期西瓜2号)、XG-S(软熟期西瓜2号)、FHM-F

(坚熟期粉红蜜)、FHM-S(软熟期粉红蜜)。对原始测序数据Raw data进行质量控制,获得高质量的质控数据Clean data。利用HISAT2 2.1.0软件将Clean data与番石榴参考基因组GCA_023344035.1 (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/023/344/035/GCA_023344035.1_EMB_PsiGuava_1.0/)进行比对,获得用于后续转录本组装与表达量计算的Mapped data。

1.4 差异表达基因鉴定与功能注释

利用DESeq2软件比较组间的差异表达基因,参数设置为 $p\text{-adjust} < 0.05$ 和 $|\log_2FC| \geq 1$ 。将基因注释到GO的各级条目,序列通过BLAST比对到Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes数据库进行KEGG注释,将 $Q\text{-value} \leq 0.05$ 的通路确定为在差异表达基因中显著富集,同时确定差异表达基因涉及的主要生物代谢途径和信号转导通路。

1.5 实时荧光定量PCR验证

以番石榴组成型表达基因*Histone3*^[4]为内参,选取8个显著差异表达的基因进行实时荧光定量PCR验证。利用Primer3 Plus在线设计特异性引物,扩增产物长度范围为100~250 bp,引物序列如表1所示。使用Roche LightCycler480 II实时荧光定量PCR仪进行检测,扩增体系为:2×SGExcel Fast SYBR Mixture 10 μL ,引物各0.4 μL ,cDNA 2 μL ,最后用dd H₂O补足至20 μL 。扩增程序为:95℃预变性3 min;95℃变性5 s,60℃退火20 s,共35次循环。每个样品进行3次生物学重复,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算样品的相对表达量。

表1 特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequence

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
Histone3	GGGCAATTTACGGACAAGC	TGCCCGTAAGTCTGCCCTA
UGT1	CATCCGAGCGAGTACCAGTC	CTCGGAATGGGCAACTCAGT
UGT2	TTCAAGAACCCGAAGTCCCG	AGTTCACGCCGGAGTTCAT
BGAL	TCCCTCGGGAAGTATGAGCA	GTTGAAGATGGCATCGACGC
EXP	CTGGTGCTGATCTCCAACGT	AGACCTGAAGTTCTTGCCG
PG1	GTCAGGGGAAGATGTGGTGG	ATTGGGGCATTGAGGGGAG
XTH1	TTGAGCACCAATCGAGCTGT	GTACCGAGCCTGGTCATAGC
PG2	CGGGGACAATGGGACTATCG	CGAGATCTGGATGGTGTCGG
XTH2	AAAGATGGTCCCGGCGATT	GACCAGTTCTGTTCCCCAGG

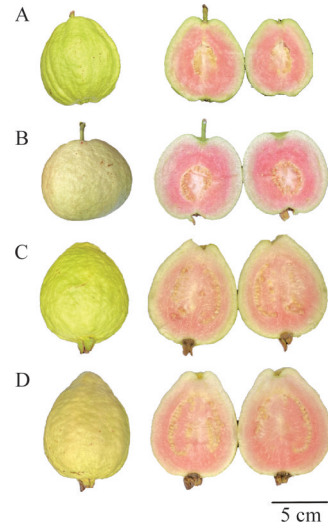
2 结果与分析

2.1 番石榴品种果实质地差异分析

番石榴坚熟期果实约八成熟时,果面颜色为浅绿色,果肉颜色偏白,肉质较硬;软熟期果实完全成熟,粉红蜜果面颜色为白绿色,果肉颜色为粉红色,西瓜2号果面颜色为淡黄色,果肉颜色为淡粉色(图1)。通过质构仪测定不同品种番石榴果肉在坚熟期和软熟期的质地特性,结果表明,相对于坚熟期,2个番石榴品种在软熟期的硬度、脆度、胶粘性 and 咀嚼性均显著降低,而黏着性显著增高(图2)。相较于粉红蜜,西瓜2号在软熟期的脆度和硬度降幅更大,质地特性变化较快,果肉快速变绵软,反映了酥脆和软肉番石榴成熟时口感的变化差异。

2.2 转录组测序数据质量分析

对原始数据进行质量控制后共获得 96.97 Gb Clean data。测序准确度分析显示,各样品 Q20 碱基百分比均在 97.5% 以上, Q30 碱基百分比均在 93.3% 以上, GC 含量介于 48.86~50.03% 之间(表2),以上结果表明测序数据质量较高,符合后续分析的标准。

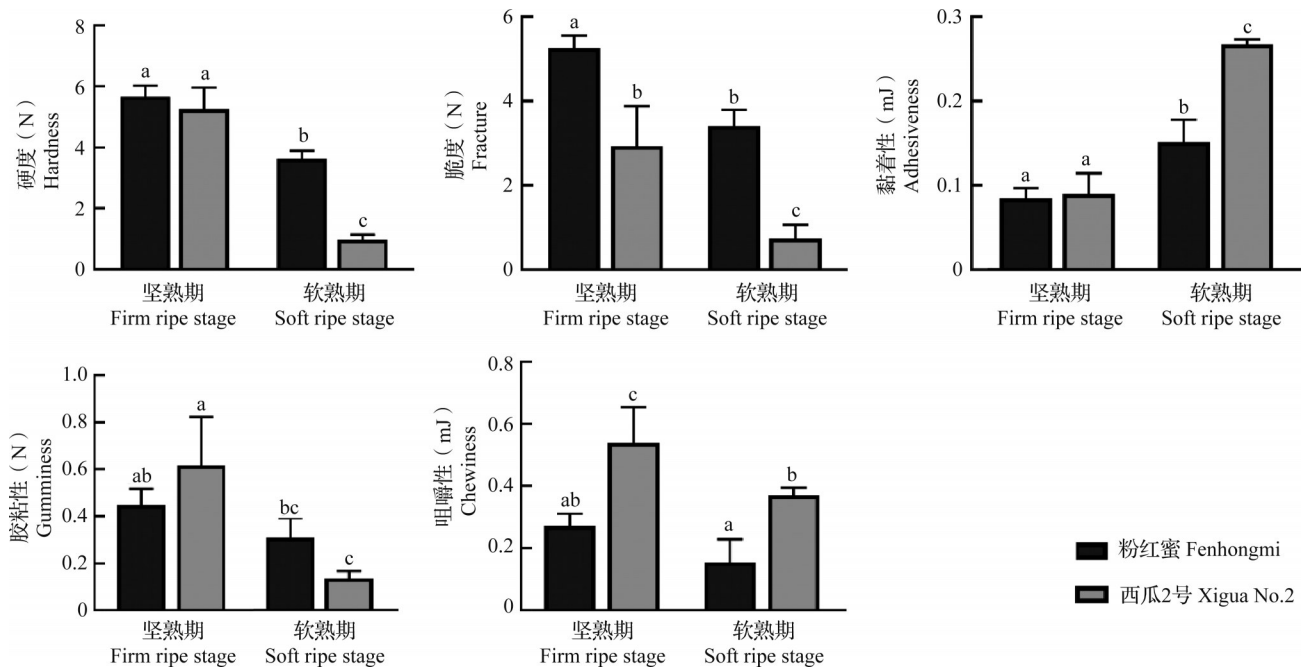


A: 粉红蜜坚熟期; B: 粉红蜜软熟期; C: 西瓜2号坚熟期; D: 西瓜2号软熟期

A: Firm ripe stage of Fenhongmi; B: Soft ripe stage of Fenhongmi; C: Firm ripe stage of Xigua No.2; D: Soft ripe stage of Xigua No.2

图1 成熟期果实质地不同的2个番石榴品种

Fig. 1 Two guava varieties with different fruit textures at maturity



不同字母表示材料间在 $P < 0.05$ 水平存在显著性差异

Different letters indicate significant differences between materials at $P < 0.05$ level

图2 坚熟期与软熟期番石榴果实口感及质地参数变化

Fig. 2 Changes of taste and texture parameters of guava fruit at firm ripe stage and soft ripe stage

2.3 差异表达基因分析

2.3.1 差异表达基因数量分析 如表3所示,粉红蜜软熟期果实相对于粉红蜜坚熟期果实(FHM-F vs FHM-S)、西瓜2号软熟期果实相对于西瓜2号坚熟

期果实(XG-F vs XG-S)、西瓜2号软熟期果实相对于粉红蜜软熟期果实(FHM-S vs XG-S)和西瓜2号坚熟期果实相对于粉红蜜坚熟期果实(FHM-F vs XG-F)中分别有 137 个、2760 个、4787 个和 2377 个

差异表达基因。随着果实从坚熟到软熟,西瓜2号的差异表达基因数目比粉红蜜多,在质地变软的过程中发生了更多的新陈代谢变化。软熟期两个品

种之间的差异表达基因数目约为坚熟期差异表达基因数目的2倍,表明越到果实成熟后期,2个品种的差异越大。

表2 转录组测序数据统计

Table 2 RNA-seq sequencing data statistics

样品序号 Sample number	原始测序数据的总条目数 Raw reads	质控后测序数据的总条目数 Clean reads	错误率(%) Error rate	Q20(%)	Q30(%)	GC含量(%) GC content
FHM-S-1	47396584	46918538	0.0245	98.24	94.70	49.64
FHM-S-2	46286836	45898036	0.0245	98.24	94.69	49.60
FHM-S-3	65848230	65183046	0.0244	98.27	94.81	49.96
FHM-F-1	51112066	50663096	0.0245	98.24	94.70	49.78
FHM-F-2	55516978	55051174	0.0246	98.20	94.56	49.41
FHM-F-3	66860244	66252648	0.0244	98.29	94.81	49.52
XG-S-1	52051112	51544512	0.0257	97.67	93.58	49.96
XG-S-2	54979530	54429912	0.0259	97.58	93.37	50.03
XG-S-3	51055408	50504324	0.0256	97.72	93.70	49.75
XG-F-1	52595056	51980978	0.0256	97.73	93.71	49.21
XG-F-2	47357094	46934578	0.0256	97.73	93.64	48.86
XG-F-3	64320650	63777228	0.0255	97.78	93.80	49.05

FHM-S: 粉红蜜软熟期果实; FHM-F: 粉红蜜坚熟期果实; XG-S: 西瓜2号软熟期果实; XG-F: 西瓜2号坚熟期果实; -1、-2和-3表示3个重复; 下同

FHM-S: Fenhongmi fruit at soft ripe stage; FHM-F: Fenhongmi fruit at firm ripe stage; XG-S: Xigua No.2 fruit at soft ripe stage; XG-F: Xigua No.2 fruit at firm ripe stage; -1、-2 and -3 represent three duplicates; The same as below

表3 差异表达基因数目统计

Table 3 Differentially expressed genes (DEGs) statistics

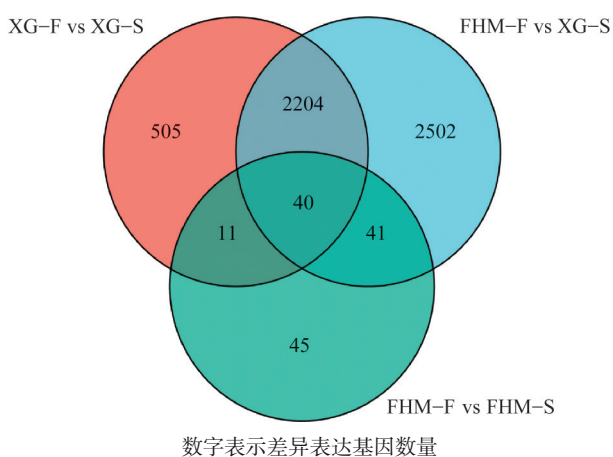
样本比对分组 Sample comparison grouping	上调基因数目 Number of up-regulated genes	下调基因数目 Number of down-regulated genes	差异表达基因数目 Number of differentially expressed genes
FHM-F vs FHM-S	71	66	137
XG-F vs XG-S	1008	1752	2760
FHM-S vs XG-S	2804	1983	4787
FHM-F vs XG-F	1233	1144	2377

vs: 比较组中为后者相较于前者, 下同

vs: In the comparison group, the latter was compared with the former, the same as below

筛选西瓜2号与粉红蜜品种内和品种间的差异表达基因制作维恩图(图3), 结果表明有51个基因在XG-F vs XG-S和FHM-F vs FHM-S共同差异表达, 2244个基因在XG-F vs XG-S和FHM-S vs XG-S共同差异表达。

2.3.2 差异表达基因GO和KEGG富集分析 对XG-F vs XG-S和FHM-S vs XG-S的差异表达基因进行GO富集分析, 两者富集的GO条目结果一致, 包括生物过程、细胞组分和分子功能3个分类下的38个GO条目, 同一GO条目下FHM-S vs XG-S的差异表达基因数量比XG-F vs XG-S多(图4)。生物过程共富集到14个GO条目, 主要有细胞过程(Cellular process)、代谢进程(Metabolic process)、生



The number represents the number of differentially expressed genes

图3 差异表达基因韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of DEGs

物调节(Biological regulation)、应激反应(Response to stimulus)和定位(Localization)等功能分组。细胞组分共富集到11个GO条目,主要有细胞部分(Cell part)、膜部分(Membrane part)、细胞器(Organelle)、

膜结构(Membrane)等功能分组。分子功能共富集到13个GO条目,占比最高的为催化活性(Catalytic activity)与结合活性(Binding)。

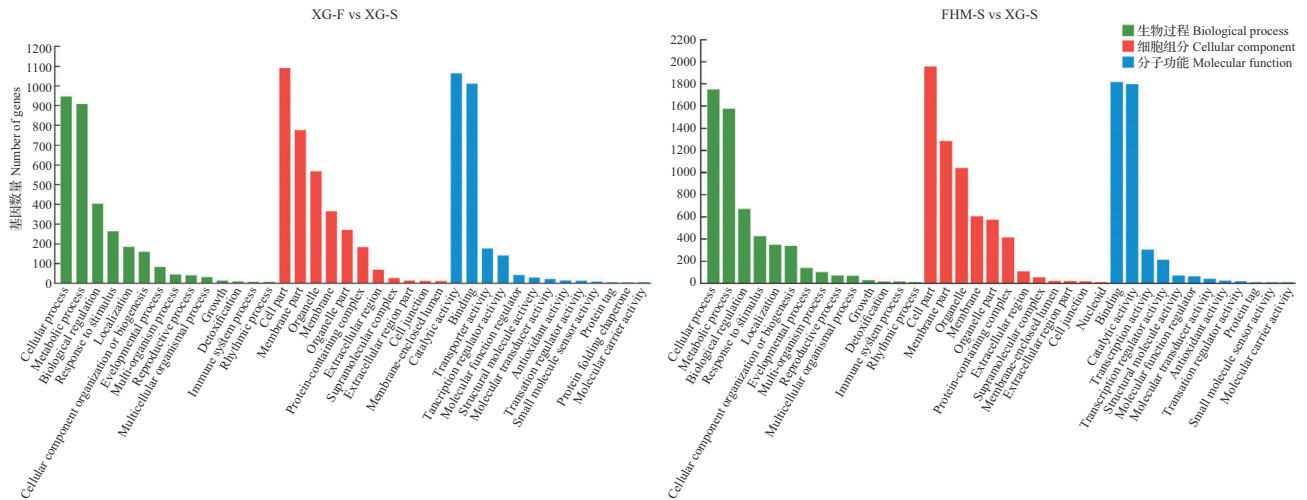


图4 差异表达基因GO富集注释图
Fig. 4 GO enrichment annotation of DEGs

对差异表达基因进行KEGG代谢通路富集分析(图5),两个品种软熟期共有82个差异表达基因在光合作用(Photosynthesis)、光合作用天线蛋白(Photosynthetic-antenna proteins)、半乳糖代谢(Galactose metabolism)、果糖和甘露糖代谢

(Fructose mannose metabolism)这4个通路中显著富集。品种内比较组富集到的代谢通路明显多于品种间比较组,西瓜2号软熟期和软熟期的比较组共有166个差异表达基因在8个KEGG代谢通路中显著富集,富集到植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)通路的基因最多,表明软肉番石榴肉质变化主要与植物激素信号转导密切相关。

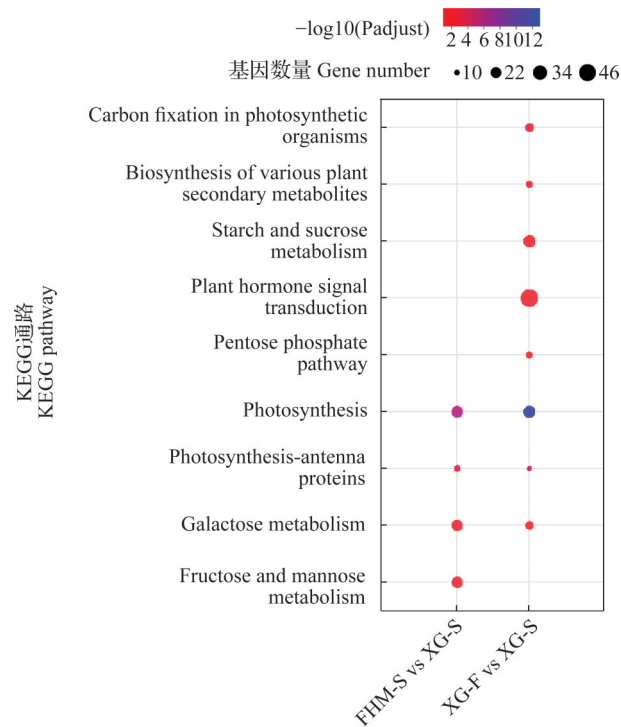


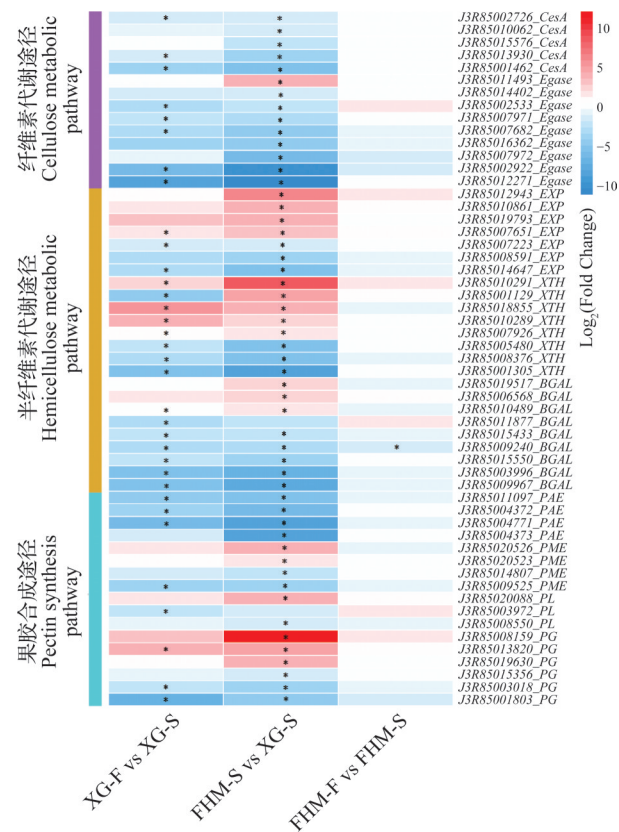
图5 差异表达基因KEGG通路富集
Fig. 5 KEGG pathway enrichment of DEGs

2.4 番石榴果实质地相关候选基因发掘

根据差异表达基因的功能富集分析结果,初步确定在细胞壁代谢途径、木质素生物合成途径和植物激素代谢途径方面,两个品种在果实软化过程中存在差异,这些代谢途径可能是决定番石榴果实质地的变化。

2.4.1 细胞壁代谢途径差异表达基因分析 如图6所示,在纤维素代谢途径中,纤维素合成酶基因 *CesA* 与内切葡聚糖酶基因 *Egase* 大多显著下调表达,其中 *J3R85002922_Egase* 和 *J3R85012271_Egase* 差异倍数较大。在半纤维素代谢途径中,4个膨胀素基因 (*J3R85012943_EXP*、*J3R85010861_EXP*、*J3R85019793_EXP*、*J3R85007651_EXP*)、5个木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 (*J3R85010291_XTH*、*J3R85001129_XTH*、*J3R85018855_XTH*、*J3R85010289_XTH*、*J3R85007926_XTH*) 在 FHM-S vs XG-S 分组显著上调表达,5个β-半乳糖苷酶基因 (*J3R85015433_*

BGAL、*J3R85009240_BGAL*、*J3R85015550_BGAL*、*J3R85003996_BGAL*、*J3R85009967_BGAL*) 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组显著下调表达。在果胶合成代谢途径中, 4 个果胶乙酰酯酶基因 *PAE* 在 FHM-S vs XG-S 分组显著下调表达, 2 个果胶甲酯酶基因 (*J3R85020526_PME*、*J3R85020523_PME*) 和果胶裂解酶基因 *J3R85020088_PL* 在 FHM-S vs XG-S 分组显著上调表达, 多聚半乳糖醛酸酶基因 *J3R85008159_PG* 在 FHM-S vs XG-S 分组差异倍数最高。



色块中*表示组内显著, $P < 0.05$; 下同

* in color block means intraclass significant, $P < 0.05$; The same as below

图6 细胞壁代谢途径相关差异基因表达分析

Fig. 6 Analysis of differential gene expression of cell wall metabolic pathway

2.4.2 木质素生物合成途径差异表达基因分析
本研究共鉴定出 28 个与木质素生物合成途径相关的差异表达基因 (图 7), 苯丙氨酸解氨酶基因 *J3R8509222-PAL*、2 个 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 (*J3R8518196_4CL*、*J3R8515124_4CL*)、肉桂酰辅酶 A 还原酶基因 *J3R8505621_CCR* 与肉桂醇脱氢酶基因 *J3R8504184_CAD* 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组均显著上调表达。3 个咖啡酸-O-甲基转

移酶基因 *COMT* 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组均显著下调表达。

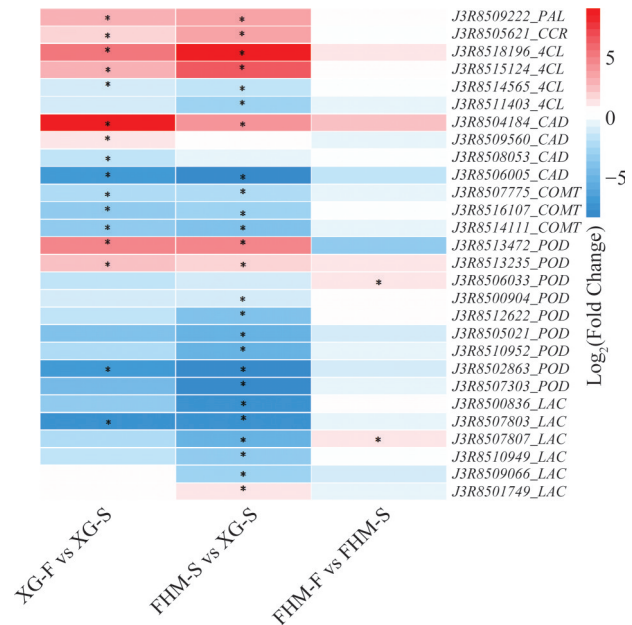


图7 木质素生物合成途径相关差异基因表达分析

Fig. 7 Analysis of differential gene expression of lignin synthesis pathway

6 个过氧化物酶基因 (*J3R8500904_POD*、*J3R8512622_POD*、*J3R8505021_POD*、*J3R8510952_POD*、*J3R8502863_POD*、*J3R8507303_POD*)、5 个漆酶基因 (*J3R8500836_LAC*、*J3R8507803_LAC*、*J3R8507807_LAC*、*J3R8510949_LAC*、*J3R8509066_LAC*) 和肉桂醇脱氢酶基因 *J3R8506005_CAD* 在 FHM-S vs XG-S 分组显著下调表达。

2.4.3 植物激素代谢途径差异表达基因分析
三个比较组共筛选出 49 个植物激素代谢途径中的差异基因, 包括 27 个生长素相关、10 个脱落酸相关、4 个乙烯相关和 8 个油菜素甾醇相关的基因 (图 8)。

在生长素信号转导通路中, 早期生长素响应基因 *AUX1/LAX*、*IAA* 和 *SAUR* 与生长素响应因子 *ARF* 下调表达的基因占比较多, 生长素偶联基因 *J3R85018648_GH3* 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组均显著上调表达。在脱落酸信号转导通路中, ABA 感受器基因 (*J3R85000509_PP2C*、*J3R85018611_PP2C*) 在 FHM-S vs XG-S 分组显著上调表达, ABA 受体基因 (*J3R85016217_PYL*、*J3R85009070_PYL*) 和蔗糖非酵解型蛋白激酶 2 基因 *J3R85001995_SnRK2* 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组均显著上调表达。乙烯与油菜素甾醇信号转导通路中, 乙烯相关的差异基因 *J3R85001634_*

ETR/ERS、*J3R85001472_EBF1/2*、*J3R85010568_EBF1/2*和*J3R85015941_EIN3*在FHM-S vs XG-S分组显著上调表达,木葡聚糖转移酶基因*J3R85010291_TCH4*差异倍数较高,可能是影响番石榴果实质地变化的关键基因。

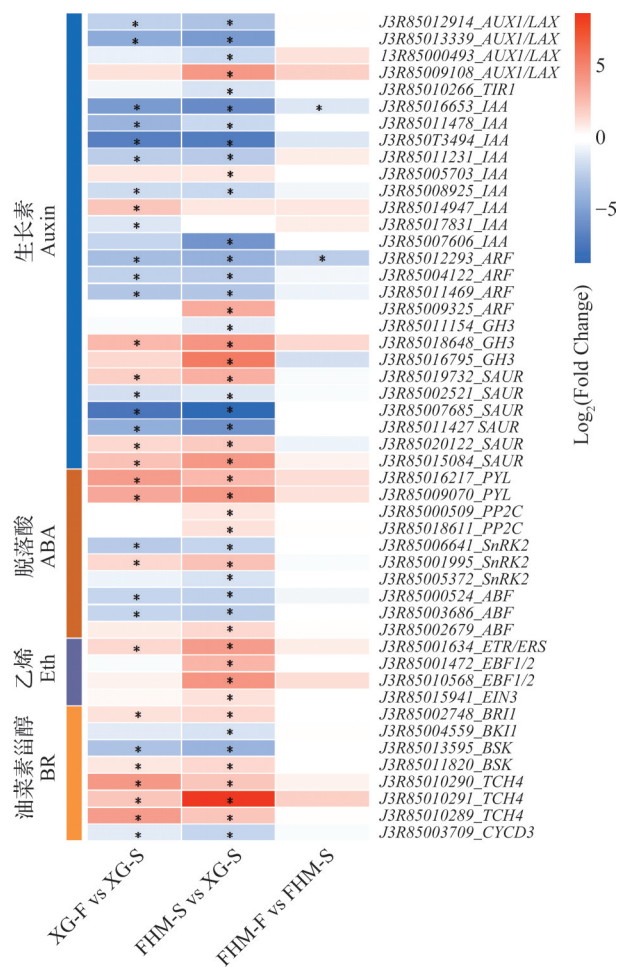


图8 植物激素代谢途径相关差异基因表达分析

Fig. 8 Analysis of differential gene expression of Plant hormone metabolic pathway

2.4.4 转录因子鉴定与表达分析 本研究中共有306个差异表达基因被预测为转录因子,可划分为38个基因家族,包括bHLH、C2H2、B3、bZIP、ERF、MYB、NAC和WRKY等。

对细胞壁代谢途径、植物激素代谢途径和木质素生物合成途径的差异表达基因与转录因子进行相关性分析,相关性热图(图9A)显示20个细胞壁途径基因、22个植物激素途径基因、10个木质素途径基因和72个转录因子具有不同程度的相关性,其中*J3R85011891_C3H*与生长素途径基因*J3R85001606_LAA*相关性系数(0.993)最高。相关性网络图(图9B)显示MYB_related与NAC转录因子的节点较大

且处于网络位置的中心,其次是MYB与B3,这些转录因子具有较多相似性的代谢通路的基因,可能具有功能相关性。

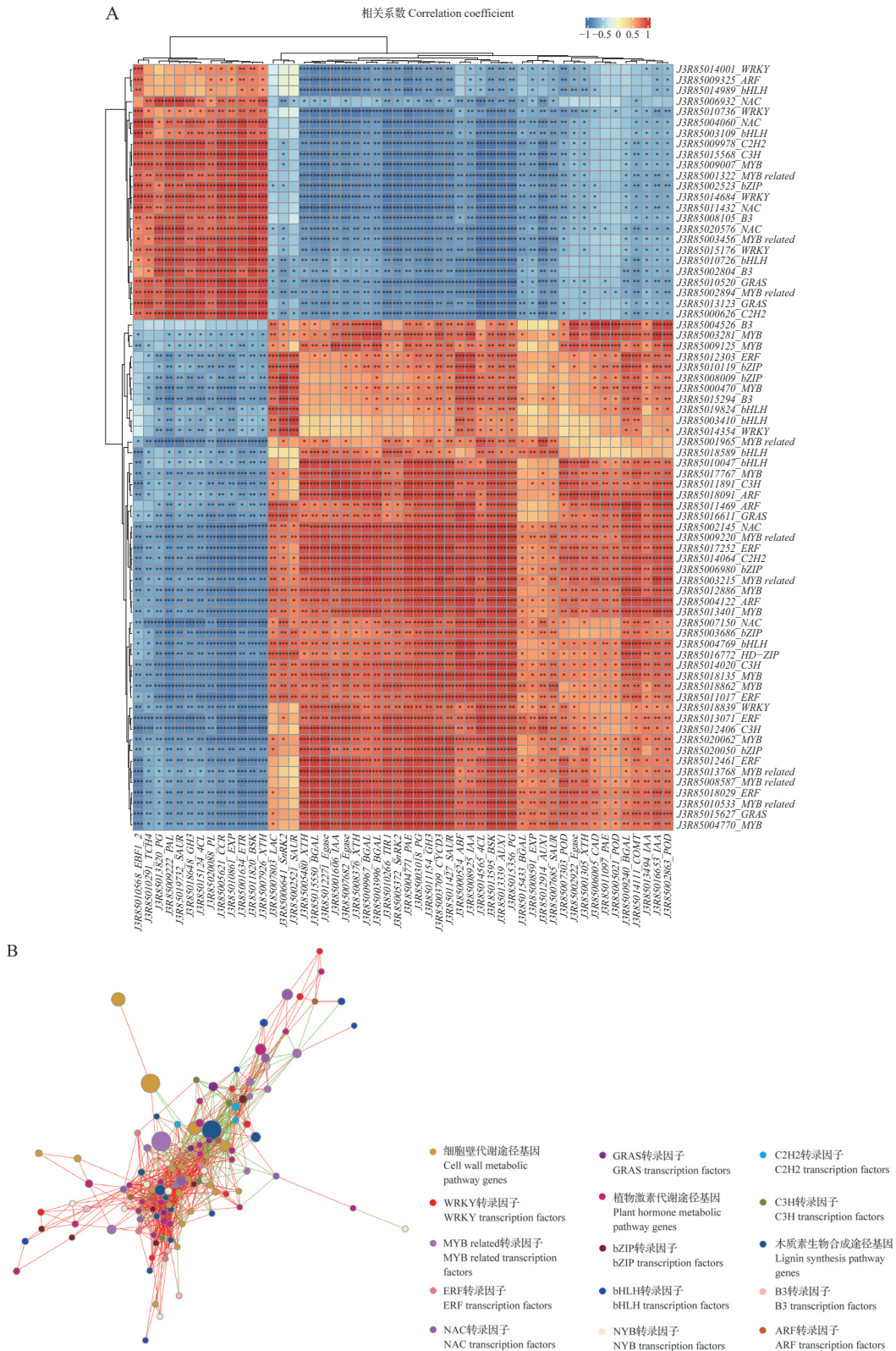
对筛选出的转录因子差异表达进行分析(图10),3个bZIP家族基因(*J3R85003686_bZIP*、*J3R85020050_bZIP*、*J3R85006980_bZIP*)、5个ERF家族基因(*J3R85011017_ERF*、*J3R85013071_ERF*、*J3R85017252_ERF*、*J3R85012303_ERF*、*J3R85012461_ERF*)和4个MYB家族基因(*J3R85003281_MYB*、*J3R85018135_MYB*、*J3R85004770_MYB*、*J3R85017767_MYB*)在XG-F vs XG-S与FHM-S vs XG-S分组均显著下调表达。4个NAC家族基因(*J3R85004060_NAC*、*J3R85006932_NAC*、*J3R85011432_NAC*、*J3R85020576_NAC*)与4个WRKY家族基因(*J3R85015176_WRKY*、*J3R85014001_WRKY*、*J3R85014684_WRKY*、*J3R85010736_WRKY*)在FHM-S vs XG-S分组显著上调表达。3个bHLH家族基因(*J3R85010726_bHLH*、*J3R85003109_bHLH*、*J3R85014989_bHLH*)在FHM-S vs XG-S分组显著上调表达。差异倍数较高的上调基因为*J3R85000626_C2H2*、*J3R85004060_NAC*、*J3R85006932_NAC*和*J3R85008105_B3*,差异倍数较高的下调基因为*J3R85004770_MYB*、*J3R85012461_ERF*、*J3R85017767_MYB*和*J3R85011891_C3H*。

2.5 实时荧光定量PCR验证

为了检验转录组测序的结果,选择植物次生代谢物生物合成与细胞壁代谢途径通路上的8个差异表达基因进行验证。差异基因的实时荧光定量PCR上下调表达变化趋势与转录组测序的结果一致,说明本研究中转录组测序结果的高保真性和一致性(图11)。

3 讨论

果实的成熟软化是番石榴研究的重要内容之一,软化过程受多种基因的调控。本研究中西瓜2号软熟期的硬度、脆度与胶粘性均显著低于粉红蜜。转录组数据显示软熟期品种间比较组的差异基因数目最多,差异表达基因主要在光合作用、光合作用天线蛋白、半乳糖代谢和植物激素信号转导途径富集。西瓜2号不同时期的比较组与品种间比较组差异表达基因均富集到光合作用与光合作用天线蛋白通路,光合作用固定碳产生的淀粉对于维持细胞膨压有重要作用,成熟时淀粉的降解导致果实软化^[18],表明番石榴的果实软化可能与淀粉降解相关。



A: 相关性热图, 色块中*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$; B: 相关性网络图, 红色连线表示正相关, 绿色连线表示负相关, 节点大小表示该基因的 degree 值

A: Correlation heat map, color block * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$, *** means $P < 0.001$; B: Correlation network diagram, red lines represent positive correlation, green lines represent negative correlation, node size represents the degree of the gene

图9 细胞壁代谢途径基因、植物激素代谢途径基因、木质素生物合成途径基因与转录因子相关性分析

Fig. 9 Gene correlation analysis of cell wall metabolic pathway, plant hormone metabolic pathway, lignin biosynthesis pathway and transcription factors

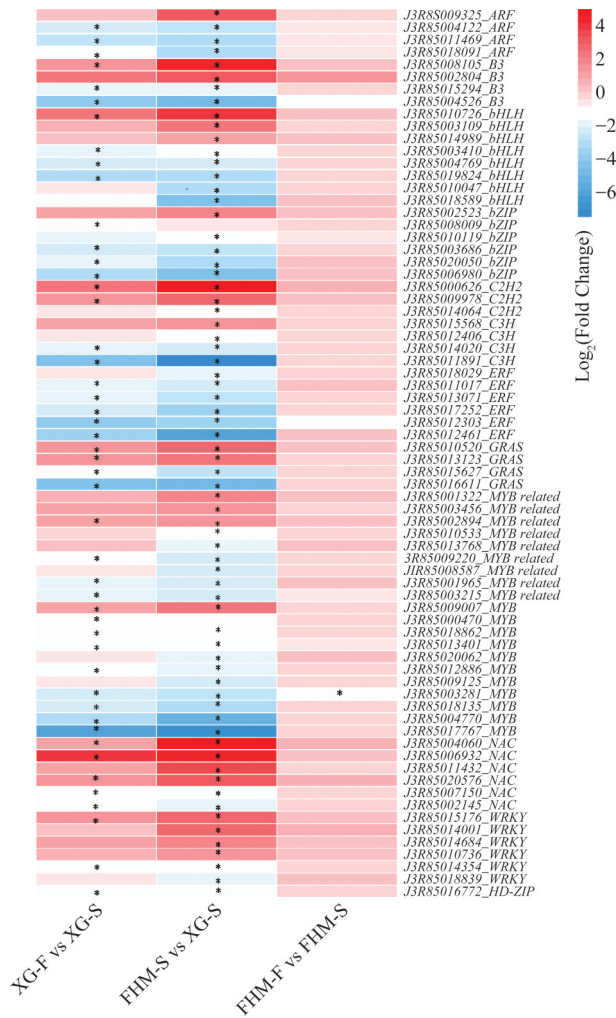


图 10 转录因子差异表达分析

Fig. 10 Differential expression analysis of transcription factors

细胞壁结构中果胶物质、纤维素、半纤维素的降解是影响果实质地的重要因素^[19]。PG是一种果胶降解酶,在草莓中沉默PG基因可以显著提高果实硬度^[20]。郭绍雷等^[21]发现XTH通过调控木葡聚糖代谢从而降解细胞壁,PpXTH33表达量升高时桃果实硬度显著降低,是参与桃果实软化的重要候选基因。Wang等^[22]发现SIXTH5可以调控番茄果实的软化,在软化过程中表达量显著升高。本研究鉴定出西瓜2号与粉红蜜细胞壁代谢途径差异基因中J3R85008159_PG和J3R85010291_XTH上调差异表达倍数明显高于其他基因,可能正向调控果实软化,这与前人的研究结果一致。在半纤维素途径中有4个膨胀素基因PgEXP表达上调,可能参与调控番石榴软化,这与赵湾等^[10]的研究结果一致。

木质素的合成与果实硬度密切相关,肉桂酰辅酶A还原酶(CCR, cinnamoyl-CoA reductase)、肉桂

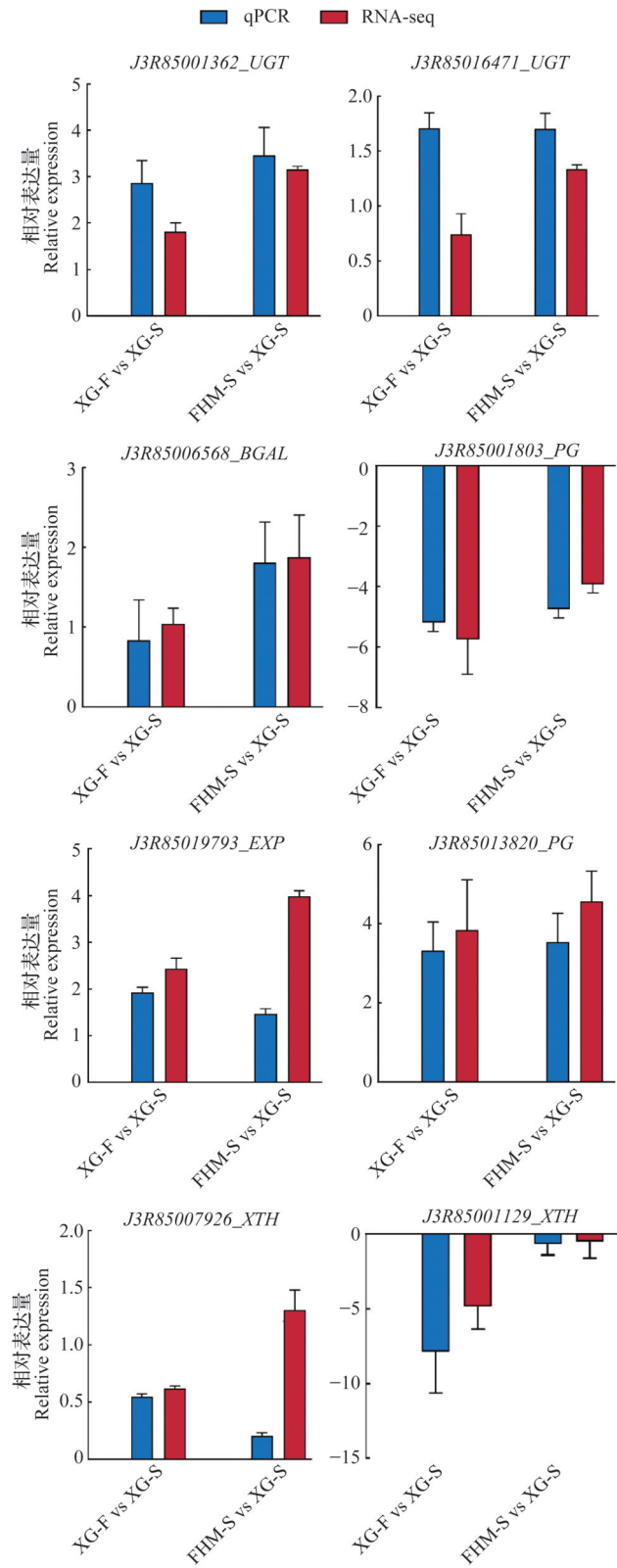


图 11 差异表达基因实时荧光定量PCR验证

Fig. 11 qRT-PCR validation of differentially expressed genes

醇脱氢酶(CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase)和过氧化物酶(POD, peroxidase)是合成木质素的关键

酶。刺梨^[23]与山楂^[24]的 POD 基因 *RrPOD1*、*RrPOD6* 与 *CpPOD72* 均参与调控果实木质素的积累, *AdPOD27* 参与调控猕猴桃的果实软化^[25]。漆酶 LAC 催化木质素单体氧化聚合成木质素, 参与水果细胞壁中木质素的合成, *LAC* 基因在水果成熟软化阶段迅速下调表达, 导致果实软化并释放香气和风味化合物^[26]。Liu 等^[27]发现蓝莓在转色期果实变软时, *VcCOMT38*、*VcCOMT57*、*VcCOMT40* 和 *VcCOMT92* 表达量下降, 木质素含量也呈下降趋势。本研究鉴定出木质素合成途径相关的差异表达基因 *CAD*、*POD*、*COMT* 和 *LAC*, 这些基因在 FHM-S vs XG-S 分组显著下调表达, 与前人研究结果一致, 表明上述基因可能通过负调控木质素的合成从而影响番石榴品种间的果实质地差异。其中, *J3R8506005_CAD*、*J3R8502863_POD*、*J3R8507303_POD*、*J3R8500836_LAC* 和 *J3R8507803_LAC* 下调倍数较高, 可能起关键作用。

除细胞壁代谢外, 植物激素途径与转录因子的调控也与果实软化相关。生长素抑制 *PG* 基因和淀粉酶基因的表达^[28-29], 过表达 *PpIAA5* 可以负调控桃细胞壁降解酶的酶活, 抑制 *PpPG* 的表达, 延缓果实成熟软化^[30]。也有研究显示生长素可以促进果实软化, Li 等^[31]发现过表达番茄生长素响应基因 *PpIAA1* 可以加快番茄软化。桃生长素响应因子 *PpIAA1* 与乙烯响应因子 *PpERF4* 的相互作用可以提高脱落酸生物合成基因 *PpNCED2* 和 *PpPG1* 的转录水平, 促进桃果实成熟软化^[14]。以上研究表明生长素信号转导对于加速或延缓果实软化作用具有差异, 本研究中生长素响应基因 *AUX1/LAX*、*IAA* 和 *ARF* 主要表现为下调表达, 生长素偶联基因 *J3R85018648_GH3* 在 XG-F vs XG-S 与 FHM-S vs XG-S 分组均显著上调表达, 生长素在番石榴果实软化中的作用有待进一步探索。*TCH4* 基因编码木葡聚糖内转糖基酶, 过表达拟南芥 *TCH4* 基因可以降低细胞壁的机械强度^[32], 本研究油菜素甾醇代谢途径中 *J3R85010291_TCH4* 可能是影响番石榴果实质地变化的关键基因。

大量研究表明脱落酸和乙烯是调控果实成熟软化的关键激素, 转录因子在基因表达调控的过程中起重要作用。脱落酸和乙烯相关基因在葡萄成熟过程中受到一系列转录因子的差异调节, 包括 *MYB*、*NAC*、*ERF* 和 *bHLH* 等^[33]。在番茄^[34]、香蕉^[35]和番木瓜^[36]中均鉴定出延缓果实软化的 *MYB* 转录因子。苹果 *ERF* 转录因子在成熟过程中抑制

乙烯的合成, 延缓果实成熟^[37]。过表达番茄 *NAC* 转录因子 *SNAC4* 可以促进乙烯合成和脱落酸信号转导通路上关键基因 *ACS2*、*ACO1*、*NCED1/2*、*SnRK2* 和 *PYL9* 的表达, 促使细胞壁途径上软化相关基因 *XTH* 和 *PG* 表达上调, 促进番茄果实软化进程^[38]。葡萄 *bHLH075* 转录因子可以诱导浆果软化相关基因和 *WRKY* 转录因子的表达^[39]。根据前人研究进展与转录组测序数据, 本研究筛选出脱落酸和乙烯途径上调表达的 7 个基因 (*J3R85016217_PYL*、*J3R85009070_PYL*、*J3R85001995_SnRK2*、*J3R85001634_ETR/ERS*、*J3R85001472_EBF1/2*、*J3R85010568_EBF1/2* 和 *J3R85015941_EIN3*) 和相关的转录因子家族基因 (*J3R85017767_MYB*、*J3R85004770_MYB*、*J3R85004060_NAC*、*J3R85006932_NAC*、*J3R85012461_ERF*、*J3R85010726_bHLH*、*J3R85003109_bHLH*、*J3R85014989_bHLH*、*J3R85015176_WRKY*、*J3R85014001_WRKY*、*J3R85014684_WRKY*、*J3R85010736_WRKY*), 这些转录因子与脱落酸和乙烯信号转导通路协同调控, 通过影响细胞壁代谢途径的软化基因影响番石榴果实质地。

参考文献

- [1] Nimisha S, Kherwar D, Ajay K M, Singh B, Usha K. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective. *Scientia Horticulturae*, 2013, 164: 578-588
- [2] 吴妙鸿, 邱珊莲, 林宝妹, 张帅, 洪佳敏, 郑开斌. 番石榴 4 个品种叶和幼果的生物活性和酚类成分研究. *热带亚热带植物学报*, 2021, 29(6): 694-702
Wu M H, Qiu S L, Lin B M, Zhang S, Hong J M, Zheng K B. Biological activity and phenolic constituents in extracts from leaves and young fruits of four guava cultivars. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2021, 29(6): 694-702
- [3] 吴妙鸿, 邱珊莲, 林宝妹, 郑开斌. 9 个品种番石榴果实提取抗氧化活性比较研究. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(18): 6082-6089
Wu M H, Qiu S L, Lin B M, Zheng K B. Antioxidant activities of fruit extracts from 9 kinds of cultivars of *Psidium guajava* L.. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(18): 6082-6089
- [4] Mittal A, Yadav I S, Arora N K, Boora R S, Singh K. RNA-sequencing based gene expression landscape of guava cv. Allahabad Safeda and comparative analysis to colored cultivars. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 484
- [5] Pose S, Paniagua C, Matas A J, Gunning A P, Morris V J, Quesada M A, Mercado J A. A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. *Trends in Food Science*

- and Technology, 2019(87): 47-58
- [6] 高原原,曹洪波,李东东,安佳乐,张学英,陈海江.不同肉质桃果实成熟过程中细胞壁相关酶活性变化.北方园艺,2023(9):15-22
Gao Y Y, Cao H B, Li D D, An J L, Zhang X Y, Chen H J. Different meat peach fruits during the mature process of the cell wall, enzyme activity changes in enzymes. Northern Horticulture, 2023(9): 15-22
- [7] 张群,周文化,谭欢,刘伟.葡萄果肉组织的能量水平和细胞壁代谢对其自溶软化的影响.食品科学,2018,39(1):264-272
Zhang Q, Zhou W H, Tan H, Liu W. Effects of energy and cell wall metabolism on aril breakdown in grape fruits. Food Science, 2018, 39(1): 264-272
- [8] 沈颖,李芳东,王玉霞,张序,李延菊,赵慧,张福兴.甜樱桃果实发育过程中细胞壁组分及其降解酶活性的变化.果树学报,2020,37(5):677-686
Shen Y, Li F D, Wang Y X, Zhang X, Li Y J, Zhao H, Zhang F X. During the actual development of sweet cherry fruits, the changes in cell wall group points and its degradation enzyme activity. Journal of Fruit Science, 2020, 37(5): 677-686
- [9] 李佳莹,宫树森,秦英,金璨,吴田.海巴戟果实软化相关基因*McXTH*的克隆和表达分析.四川农业大学学报,2024,42(1):94-102
Li J Y, Gong S S, Qin Y, Jin C, Wu T. Cloning and expression analysis of *McXTH* associated with fruit softening in *Morinda citrifolia*. Journal of Sichuan Agricultural University, 2024, 42(1): 94-102
- [10] 赵湾湾,冯力,胡绍彬,代亚兰,李春侠,赵秋月,郑小华.番木瓜果实软化相关*CpEXPA2*基因的克隆与表达分析.果树学报,2018,35(7):785-793
Zhao W W, Feng L, Hu S B, Dai Y L, Li C X, Zhao Q Y, Zheng X H. Cloning and expression analysis of *CpEXPA2* gene related to softening of papaya fruit. Journal of Fruit Science, 2018, 35(7): 785-793
- [11] Peng Z, Liu G, Li H, Wang Y, Gao H. Molecular and genetic events determining the softening of fleshy fruits: A comprehensive review. The International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12482
- [12] Hu Z L, Deng L, Chen X Q, Wang P Q, Chen G P. Co-suppression of the *EIN2*-homology gene *LeEIN2* inhibits fruit ripening and reduces ethylene sensitivity in tomato. Russian Journal of Plant Physiology, 2010, 57: 554-559
- [13] Kai W, Wang J, Liang B, Fu Y, Zheng Y, Zhang W, Leng P. *PYL9* is involved in the regulation of ABA signaling during tomato fruit ripening. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(21): 6305-6319
- [14] Wang X, Pan L, Wang Y, Meng J, Deng L, Niu L, Zeng W. *PpIAA1* and *PpERF4* form a positive feedback loop to regulate peach fruit ripening by integrating auxin and ethylene signals. Plant Science, 2021, 313: 111084
- [15] 肖嘉琪.近冰点温度贮藏对采后番石榴品质调控机制的研究.广州:广州大学,2022
Xiao J Q. Study on the effects of near-freezing temperature storage on quality control of postharvest guava. Guangzhou: Guangzhou University, 2022
- [16] 陈洪彬,王慧玲,蒋璇靓,蔡英卿,张朝坤.1-MCP对采后‘红心’番石榴果实软化的影响.中国农学通报,2021,37(18):51-56
Chen H B, Wang H L, Jiang X L, Cai Y Q, Zhang C K. 1-methylcyclopropene: Effect on the postharvest softening of 'Hongxin' guava fruits. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(18): 51-56
- [17] Chen N, Wei W, Yang Y, Chen L, Shan W, Chen J Y, Lu W J. Postharvest physiology and handling of guava fruit. Foods, 2024, 13(5): 805
- [18] 冉欣雨,黄文俊,钟彩虹.猕猴桃果实淀粉代谢研究进展.果树学报,2024,41(2):325-337
Ran X Y, Huang W J, Zhong C H. Research progress of kiwi fruits starch metabolism. Journal of Fruit Science, 2024, 41(2): 325-337
- [19] Cybulska J, Zdunek A, Psonka 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
- [20] Paniagua C, Ric P, Garcia J A, Lopez G, Blanco R. Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(22): 7103-7117
- [21] 郭绍雷,许建兰,王晓俊,宿子文,张斌斌,马瑞娟,俞明亮.桃XTH家族基因鉴定及其在桃果实贮藏过程中的表达特性.中国农业科学,2022,55(23):4702-4716
Guo S L, Xu J L, Wang X J, Su Z W, Zhang B B, Ma R J, Yu M L. Genome-wide identification and expression analysis of XTH gene in peach fruit during storage. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(23): 4702-4716
- [22] Wang D, Lu X, Wang X, Ling H, Huang N. Elucidating the role of *SIXTH5* in tomato fruit softening. Horticultural Plant Journal, 2023, 9(4): 777-788
- [23] 张小英.刺梨果实膳食纤维积累过程中相关基因的表达.贵阳:贵州大学,2021
Zhang X Y. The expression of related genes during the accumulation of dietary fiber accumulation of pear fruits. Guiyang: Guizhou University, 2021
- [24] 代红艳,闫玉娇,李晓明,李贺,张志宏.山楂过氧化物酶基因的克隆及在烟草中异位表达分析.果树学报,2015,32(6):1070-1076
Dai H Y, Yan Y J, Li X M, Li H, Zhang Z H. Cloning of peroxidase gene of hawthorn and its ectopic expression in tobacco. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1070-1076
- [25] 陈义挺,赖瑞联,冯新,高敏霞,程春振,陈文光,吴如健.猕猴桃POD基因的克隆和表达分析.热带亚热带植物学报,2019,27(1):11-18
Chen Y T, Lai R L, Feng X, Gao M X, Cheng C Z, Chen W G,

- Wu R J. Cloning and expression analysis of kiwifruit POD genes. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2019, 27 (1): 11-18
- [26] Khan M, Zhang X, Ma Z, Huang M, Yang C, Wang X, Peng J. Contribution of the *LAC* genes in fruit quality attributes of the fruit-bearing plants: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15768
- [27] Liu Y, Wang Y, Pei J, Li Y, Sun H. Genome-wide identification and characterization of *COMT* gene family during the development of blueberry fruit. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 5
- [28] 贾海锋, 赵密珍, 王庆莲, 房经贵, 赵鹏程, 刘众杰, 张成, 纠松涛. 生长素和脱落酸在草莓果实发育过程中的作用. *江苏农业科学*, 2016, 44(11): 173-176
- Jia H F, Zhao M Z, Wang Q L, Fang J G, Zhao P C, Liu Z J, Zhang C, Jiu S T. The role of IAA and ABA acid in the development of strawberry fruit. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(11): 173-176
- [29] Purgatto E, Lajolo F M, Do N J, Oliveira J R, Cordenunsi B R. Inhibition of beta-amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, 2001, 212(5-6): 823-828
- [30] 王巍. 生长素应答基因 *PpIAA5-ARF8* 对桃果实成熟软化的调控作用. 北京: 北京农学院, 2021
- Wang W. The regulation of the *PpIAA5-RF8* on the mature and softening of peach fruit. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2021
- [31] Li J, Tao X, , Li L, Mao L, Luo Z, Khan Z U, Ying T. Comprehensive RNA-Seq analysis on the regulation of tomato ripening by exogenous auxin. *PLoS ONE*, 2016, 11 (5) : 156453
- [32] Zhang C, He M, Jiang Z, Liu L, Pu J, Zhang W. The Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase gene *XTH22/TCH4* regulates plant growth by disrupting the cell wall homeostasis in *Arabidopsis* under boron deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1250
- [33] Wong D C, Lopez G R, Dimopoulos N, Gambetta G A, Castellarin S D. Combined physiological, transcriptome, and cis-regulatory element analyses indicate that key aspects of ripening, metabolism, and transcriptional program in grapes (*Vitis vinifera* L.) are differentially modulated accordingly to fruit size. *BMC Genomics*, 2016, 17: 416
- [34] Cao H, Chen J, Yue M, Xu C, Jian W, Liu Y, Li Z. Tomato transcriptional repressor MYB70 directly regulates ethylene-dependent fruit ripening. *The Plant Journal*, 2020, 104 (6) : 1568-1581
- [35] Fan Z Q, Ba L J, Shan W, Ao Y Y, Lu W J, Kuang J F. A banana R2R3-MYB transcription factor *MaMYB3* is involved in fruit ripening through modulation of starch degradation by repressing starch degradation-related genes and *MabHLH6*. *The Plant Journal*, 2018, 96(6): 1191-1205
- [36] Fu C, Chen H, Gao H, Lu Y, Han C, Han Y. Two papaya MYB proteins function in fruit ripening by regulating some genes involved in cell-wall degradation and carotenoid biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(12): 4442-4448
- [37] 李通. 苹果乙烯应答因子 ERF 调控果实成熟过程中乙烯合成的机理研究. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
- Li T. Study on mechanism of ethylene response factor ERF regulating ethylene synthesis during fruit ripening in apple. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017
- [38] 周嘉倩. 过表达 SNAC4/9 对番茄果实成熟软化的影响. 天津: 天津大学, 2021
- Zhou J Q. The effect of expressing SNAC4/9 on the mature and softening of tomato fruits. Tianjin: Tianjin University, 2021
- [39] Fasoli M, Richter C L, Zenoni S, Bertini E, Vitulo N, Dalsanto S. Timing and order of the molecular events marking the onset of berry ripening in grapevine. *Plant Physiology*, 2018, 178 (3): 1187-1206