

李浩霞,尹 跃,杨 斌,等. 枸杞果胶酯酶基因 *LbPME* 克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(18):33-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.18.006

枸杞果胶酯酶基因 *LbPME* 克隆及表达分析

李浩霞¹, 尹 跃², 杨 斌², 安 巍², 赵建华²

(1. 宁夏农林科学院荒漠化治理研究所, 宁夏银川 750002; 2. 宁夏农林科学院枸杞科学研究所/国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏银川 750002)

摘要:以宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.) 枸杞 1 号果实为材料,利用 RT-PCR 技术,克隆出 *LbPME* 的全长序列为 1 152 bp,包含完整的开放阅读框(ORF),编码有 384 个氨基酸,蛋白质分子量为 42.63 ku,理论等电点 9.20;*LbPME* 编码的蛋白包含 2 个可能的 N-糖基化结合位点(Asn46 和 Asn183),4 个底物结合位点(Thr166、Gln201、Arg301 和 Trp303)和 2 个酶活性位点(Asp224 和 Asp245)。分析发现,该蛋白由多个呈右手螺旋的 β 折叠肽链组成,且含有 1 个中空三角柱状的 PME 经典结构;*LbPME* 与茄科的烟草的同源性达到 90.86%。利用实时荧光定量技术,发现不同组织中 *LbPME* 均有表达,且在茎中最高而叶中最低,两者存在显著差异;随着果实的发育,*LbPME* 表达量呈现出先升后降趋势,在青果期表达量最高,随后显著降低,在成熟期维持较低水平。本研究结果为进一步探讨枸杞 *LbPME* 的功能奠定了基础。

关键词:枸杞;果胶酯酶基因;克隆;表达

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)18-0033-06

果胶酯酶又称果胶甲酯酶(pectin methylesterase, 简称 PME),是细胞壁代谢的关键酶之一,PME 催化果胶分子去甲酯化后易与钙离子结合,使细胞壁硬

化,延缓细胞的生长;同时,PME 在去甲酯化过程中,释放大量的氢离子,形成低 pH 值的胞外环境,聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶活性增强,造成果胶大量降解,促进细胞加快生长^[1-2]。在柑橘、香蕉、苹果、葡萄、胡萝卜、番茄、马铃薯、豌豆等植物中均有关于 PME 的报道^[3]。拟南芥 PME 基因仅在花粉中特异表达,缺失该基因会造成花粉管形态异常及种子数减少^[4],而拟南芥 PME 基因的表达受丁香假单胞杆菌番茄致病变种的诱导,当植株受到病菌感染时,该基因表达量大幅上升^[5]。豌豆根尖 PME

收稿日期:2021-01-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:32060359);宁夏自治区科技创新领军人才项目(编号:KJT2017004);宁夏自治区农业科技自主创新专项(编号:NKYJ-18-16)。

作者简介:李浩霞(1977—),女,甘肃景泰人,副研究员,主要从事早作农业及栽培生理研究。E-mail:lihaoxia0943@163.com。

通信作者:赵建华,博士,副研究员,主要从事枸杞种质遗传改良与分子生物学研究。E-mail:zhaojianhua0943@163.com。

12072-12080.

[100]陈 洁,王 娟,王怡雯,等. 影响不同农作物镉富集系数的土壤因素[J]. 环境科学,2021,42(4):2031-2039.

[101]李 冰,王昌全,李 枝,等. Cd 胁迫下杂交水稻对 Cd 的吸收及其动态变化[J]. 生态环境学报,2014,23(2):312-316.

[102]李 桃,李 军,韩 颖,等. 磷对水稻镉的亚细胞分布及化学形态的影响[J]. 农业环境科学学报,2017,36(9):1712-1718.

[103]严 勋,唐 杰,李 冰,等. 不同水稻品种对镉积累的差异及其与镉亚细胞分布的关系[J]. 生态毒理学报,2019,14(5):244-256.

[104]陈 德,叶雪珠,张 棋,等. 不同水稻品种对 Cd、Zn 的积累特性[J]. 浙江农业科学,2020,61(10):2113-2118,2121.

[105]张新柱,刘汇川,胡维军,等. 不同水稻品种对镉、砷的吸收累积特征[J]. 湖南农业科学,2020(6):20-23,30.

[106]Hyuck S K,Byoung H S,Gary O,et al. Phytoavailability-based threshold values for cadmium in soil for safer crop production[J].

Ecotoxicology and Environmental Safety,2020,201:110866.

[107]刘旭昕. 辽宁阜新地区不同林地类型对土壤质量指标的影响[J]. 安徽农学通报,2019,25(16):113-114.

[108]张 成,卜玉山,郝佳丽,等. 有机物和外源铜对小白菜生长及铜含量的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2013,33(6):477-482.

[109]唐 伟,韩 菲. 我国矿山废弃地受损生态环境的恢复探讨——以唐山石灰石矿为例[J]. 绿色科技,2013(8):199-200,205.

[110]刘玉燕,刘 敏,刘浩峰. 城市土壤重金属污染特征分析[J]. 土壤通报,2006,37(1):184-188.

[111]沈秋悦,曹志强,朱月芳,等. 重金属 Cd 污染对土壤微生物活性影响的研究[J]. 环境污染与防治,2016,38(7):11-14,24.

[112]石松林,雷 盈,覃紫其,等. 不同镉胁迫条件对土壤微生物活性的影响[J]. 现代农业科技,2019(23):153-154,156.

基因的表达与根边缘细胞的游离紧密相关,该基因表达会抑制根边缘细胞的正常游离^[6]。休眠状态的黄杉种子未检测到 PME 的活性,但逐渐增加外源 PME 浓度,会引起种子休眠的破坏和萌发^[7]。随着樱桃的果实果肉的软化,PME 活性逐渐增高^[8]。此外,通过 QTL 分析筛选出 3 个果胶酯酶参与番茄果实抗坏血酸含量的调控^[9]。在转 *CbPMEII* 和 *PMEII3* 基因拟南芥中,PME 参与低温和盐胁迫下根系生长调控^[10]。因此,PME 在植物生长发育、种子萌发和果实软化等过程中发挥着重要作用^[11]。

PME 广泛存在于高等植物中,目前已从柑橘^[12]、棉花^[13]、草莓^[14]、番茄^[15]、枇杷^[16]等中分离出 PME 基因。拟南芥 PME 基因在花和莢果整个发育阶段均有不同程度的表达^[17]。研究发现,PME 基因大多以基因家族的形式存在^[18-19],水稻有 59 个编码基因,拟南芥有 66 个编码基因,白杨有 89 个编码基因^[20-22],但目前有关于枸杞 PME 的研究国内还尚未见到报道,本研究以宁夏枸杞宁杞 1 号果实为材料,基于枸杞果实转录组测序数据,克隆出枸杞果实中 *LbPME* 的 cDNA 全长,并分析枸杞果实发育各个时期 *LbPME* 的表达特征,为进一步研究枸杞 *LbPME* 基因的功能及枸杞生长代谢机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为宁夏枸杞宁杞 1 号品种,均采自宁夏银川市西夏区芦花台园林场国家枸杞种质资源圃(106°9′ E、38°380′ N,海拔 1 100 m),选取 6 年生宁杞 1 号树 3 棵,于 2018 年 6—7 月,在果实发育的幼果期(开花后约 9 d)、青果期(开花后约 15 d)、色变期(开花后约 22 d)、初熟期(开花后约 29 d)和成熟期(开花后约 36 d),分别选取果粒大小均匀、果色一致的无病虫害的果实;在果实成熟期采集枸

杞根、茎、叶和果实,所用材料用液氮迅速冻结后,运送回国家枸杞工程中心分子生物学实验室后立即放置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及反转录 采用 Trizol 试剂盒(北京 TIANGEN 公司)提取枸杞果实的总 RNA,利用 RT-PCR 试剂盒(美国 ThermoFisher 公司)对提取的总 RNA 进行反转录,获得单链 cDNA,用于后续 *LbPME* 的克隆及表达分析。

1.2.2 目的基因克隆 依据转录组所获得的 EST 序列,设计全长引物:*LbPME*-F 和 *LbPME*-R(表 1)。以枸杞果实反转录 cDNA 为模板,扩增目的基因 *LbPME* 的全长序列。PCR 反应体系:2 × PCR Buffer 25 μL,dNTP (2 mmol/L) 10 μL,*LbPME*-F (10 μmol/L) 2 μL,*LbPME*-R (10 μmol/L) 2 μL,cDNA 模板 1 μL,KOD FX Neo(1 U/μL,Toyobo Life Science Cat) 1 μL,Millipore H₂O 补足 50 μL。PCR 反应程序:98 ℃ 预变性 5 min;98 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环;68 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体(德国 TakaRa 公司)上进行测序。

1.2.3 实时荧光定量表达分析 根据 *LbPME* 序列设计荧光定量引物 *LbPME*-qRTF 和 *LbPME*-qRTR(表 1),以 18S 基因为内参基因,在 BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应体系:Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Cat) 12.5 μL,*LbPME*-qRTF (10 μmol/L) 1 μL,*LbPME*-qRTR (10 μmol/L) 1 μL,cDNA 模板 5 μL,Millipore H₂O 补足 25 μL。内参基因 18S 使用的实时荧光定量 PCR 引物为 18S-F2 和 18S-R2。反应条件:95.0 ℃ 预变性 3 min;循环为 95.0 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 20 s,75 ℃ 读板 5 s,共 40 个循环;溶解曲线从 65 ℃ 上升到 95 ℃,每次读板上升 0.5 ℃。通

表 1 引物序列

名称	序列(5′→3′)	碱基数	T _m (℃)	产物全长 (bp)
<i>LbPME</i> -F	ATGCCAAATTTTAGACCATTTTC	22	57.2	1 152
<i>LbPME</i> -R	TTAAAAATTGATCCATTTCAGAGCC	24	60.6	
<i>LbPME</i> -qRTF	GCAGGAGTTTACACGGAGAAAAG	22	59.26	150
<i>LbPME</i> -qRTR	TGAACCAAAAAGTGCCAAGGG	20	58.88	
18S-F	AAAGGAATTGACGGAAGGGC	20	58.45	155
18S-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA	20	58.84	

过计算 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值来确定该基因的相对表达量。

1.2.4 生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对 *LbPME* 全长进行相应氨基酸序列分析; 利用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 完成蛋白基本性质分析; 采用 PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 完成亚细胞定位分析; 使用 NCBI Conserved Domains (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) 对序列的结构域和功能进行分析; 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 进行蛋白质三级结构预测分析; 在 NCBI 网站运行的 Blast 程序数据库中对 *LbPME* 氨基酸序列进行相似性搜索, 并进行了聚类分析; 利用 MEGA7 软件中提供的比对功能进行多序列比对并基于邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树 bootstrap 系数为 1 000 次, 进化距离计算采用泊松校正方法。

2 结果与分析

2.1 枸杞 *LbPME* 基因克隆分析

基于转录组测序数据分析, 发现 TR12421|c0_

g1 的 *EST* 基因在果实发育过程中 FRKM 值呈现出显著差异。以该 *EST* 序列设计特异性引物, 从枸杞果实中获得枸杞果胶酯酶基因片段 (图 1)。该片段测序长度为 1 152 bp (图 2)。经 Blast 比对发现, 该序列与果胶酯酶同源, 暂时命名为 *LbPME*, NCBI 注册号为 KX584484。

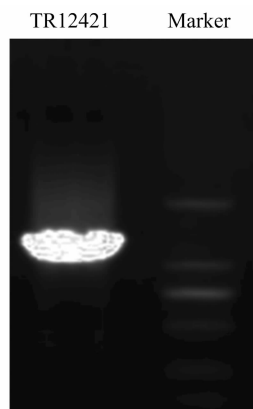


图1 *LbPE* PCR 扩增电泳检测结果

2.2 枸杞 *LbPME* 基因氨基酸序列及进化树分析

测序结果如图 2 所示。该基因含有 1 个

```

1      ATGCCAAATTTTAGACCAATTCTTCACTTCACCGCTATTCTCATTCTTCTCTCATCAACAATTGTAAGCTAATTCATTGCCACACCAAA
1      M P N F R P F L H F T A I L I L L I N N C K L I H C H T K
91     GGGCTTAGGCCAAGAGAGTGCATGGAAGAAGCAATTAAACAGTGAACATGACACAAGTTCAACATCTTGAACAACAATTTATGCAGTGG
31     G L R P K R S A W K K Q L T V (N) M T Q V Q H S E Q Q F M Q W
181    GTACAATTGTGTGAAACTTAAAGCATTCCCTCTTCAAGACAGCCAAAAATAAATTGTTCCCTTCTTACACACTCACTGTTGATAATAAT
61     V Q F V G N L K H S L F K T A K N K L F P S Y T L T V D N N
271    CCTGCTCATGGAGATTTTACTTCAATTCAAAAGCCCTTGAATTCTCTCCATTGTGCAATCTTATTAGAGTTGTTATCAAGGTCATGCA
91     P A H G D F T S I Q K A F D S L P F V N L I R V V I K V H A
361    GGAGTTTACACGGAGAAAGATAATATACCTCCATTCAAATCGTTTCATAACCATACAGGAGCAGGAGCAGATAAAACAATAATTCAATAT
121    G V Y T E K V N I P P F K S F I T I Q G A G A D K T I I Q Y
451    GGAGATACAGCAAACTGTTGGTCCAAATGGAACCCCTTGGCACTTTTGGTTACGCTACTTTTGTGTGAATTACCTTATTTCCAG
151    G D T A Q T V G P N G K P L G (T) F G S A T F A V N S P Y F Q
541    GCCAAGAATATTACTTTCAAGAACACAACACCACTGCCACCACGAGCAGTAGGAAAAACAAGCAGTAGCATTAGAAATATCAGCAGAT
181    A K (N) I T F K N T T P V P P P G A V G K (Q) A V A F R I S A D
631    ACAGCAGCCTTTGTGGGGTGTAATCTTGGGGGCACAAGATACACTTTATGATCATTTGGGCAGACATTATTACAAGATTGTTATATAT
211    T A A F V G C K F L G A Q (D) T L Y D H L G R H Y Y K D C Y I
721    GAAGGCTCTGTGGATTTCATCTTTGGCAATGCCCTTTCTTTTTTGGAGGATGTCATTTCATGCAATAGCACAGGTAAACAGGTGCAGTA
241    E G S V (D) F I F G N A L S F F E G C H L H A I A Q V T G A V
811    ACAGCACATGGAAGGAGCAGTATGTTGGAGGACACTGATTTCAGTTTGTGAAGTGAAGGTACAGGGGTGAGGTGCATTGTACCTAGGT
271    T A H G R S S M L E D T D F S F V N C K V T G S G A L Y L G
901    AGGGCATGGGTCCTTCTCTAGGGTCATCTTTGCTTATACTTTACATGGACAACATTATCATCCCTAAAGGCTGGCATAATTGGGGTGAC
301    (R) (A) (W) G P F S R V I F A Y T Y M D N I I I P K G W H N W G D
991    CCTCTTCGTGAGATGACTGTATTTTATGGGCAATATAAATGTAGTGGACAGGGGCAAGTTTTCAGGAAGAGTTTCATGGTGCAGAGAG
331    P L R E M T V F Y G Q Y K C S G P G A S F A G R V S W C R E
1081   TTAAGTGAACAAGAGCTAAGCCTTTTATTTCACTTAGCTTTATTGATGGCTCTGAATGGATCAATTTTAA
361    L T E Q E A K P F I S L S F I D G S E W I N F *
  
```

黑色方框表示起始密码子; *表示终止密码子; 黑色箭头表示使用的扩增引物; 红色三角表示可能的底物结合位点; 灰色阴影表示可能的酶活性位点; 圆圈符号表示可能的 N-糖基化位点

图2 *LbPME* 测序结果及预测氨基酸序列分析

1 152 bp 的开放阅读框,编码有 384 个氨基酸,其理论等电点和分子量分别为 9.20 和 42.63 ku,该基因的氨基酸序列分子式为 $C_{1957}H_{2954}N_{512}O_{533}S_{14}$,包含 25 个碱性氨基酸(Asp + Glu)和 36 个酸性氨基酸(Arg + Lys)。消光系数为 58 370,吸光系数为 1.369。脂肪酸系数为 77.68,不稳定系数为 28.40,是一个较稳定的蛋白。

对其结构域进行分析,结果表明,该蛋白在 Ser37 ~ Ile381 位氨基酸序列与果胶酯酶结构域(PLN02682)有较高相似性,其 E 值为 0e + 00。由图 3 可见,该蛋白具有果胶酯酶的显著特征,在 LbPME 蛋白序列中发现有 2 个可能的 N-糖基化结合位点(Asn46 和 Asn183),4 个底物结合位点,分别是 Thr166、Gln201、Arg301 和 Trp303,2 个酶活性位点 Asp224 和 Asp245,以及 1 个疑似的过渡态稳

定位点 Gln223(未在图上标示)。对其进行三级结构预测,LbPME 由多个 β 折叠呈现右手螺旋排列,形成中空的三角形柱状果胶酯酶经典结构,其中一侧为底物结合与催化位点。无规卷曲形成了 4 个底物结合位点(Thr166、Gln201、Arg301 和 Trp303),这 4 个位点形成一个四边形结构。

采用 PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 对 LbPME 蛋白进行亚细胞定位,结果表明,该酶有可能是一种分泌在细胞外蛋白,并结合到细胞壁上发挥其功能。利用 Blast 比对分析,LbPME 与茄科的同源性最高,与烟草的同源性达到 90.86%。利用 MEGA7 软件,构建果胶酯酶氨基酸序列的系统发育树(图 4),枸杞 LbPME 与茄目物种烟草、辣椒、马铃薯、牵牛花聚类到一个分枝,并与真子叶菊分支的其他 2 个目(唇形目和菊目)果胶酯酶聚类到一个大分枝上;但与真子叶蔷薇分支物种的果胶酯酶完全分离。此外,蔷薇分支物种樱桃与桑树完全聚类到不同的 2 个分枝中;但亲缘关系较远的金虎尾目胡杨与无患子目柑橘却聚到一起。这也说明果胶酯酶在植物进化过程中既具有很好的保守性,又在物种间呈现出少量变异。

2.3 枸杞 LbPME 基因表达特征分析

通过 qRT-PCR 分析发现,枸杞植株根、茎、叶、果实等组织器官中的 LbPME 均有表达,其中,茎中表达量最高,果实中次之,叶中最低,且茎中表达量显著高于其他 3 个组织器官(图 5-A)。随着枸杞果实发育,果实中 LbPME 呈现出先升后降的变化趋势(图 5-B),在青果期表达量达到最大,随后显著降低,在果实成熟时表达量维持较低水平。在果实发育的幼果期和成熟期枸杞 LbPME 表达量较低,且 2 个发育期表达量无显著差异,但显著低于其他 3 个时期,可见,枸杞 LbPME 在果实发育青果期到初熟期表现得更为活跃,但在果实成熟时可能由于细胞壁发育趋于稳定,LbPME 表达量降低。

3 结论与讨论

自 Balestrierii 等从猕猴桃克隆出第 1 个 PME 基因后^[23],对植物 PME 基因的研究愈加深入。植物天然 PME 分子量一般在 15 ~ 36 ku^[9],如胡萝卜 34.5 ku^[24],大豆 33 ku^[25],脐橙 36.2 ku^[26]。在本研究中,成功克隆出枸杞 LbPME 全长为 1 152 bp,包含 1 个完整的开放阅读框(ORF),编码 383 个氨基酸,其理论等电点和分子量分别为 9.20 和

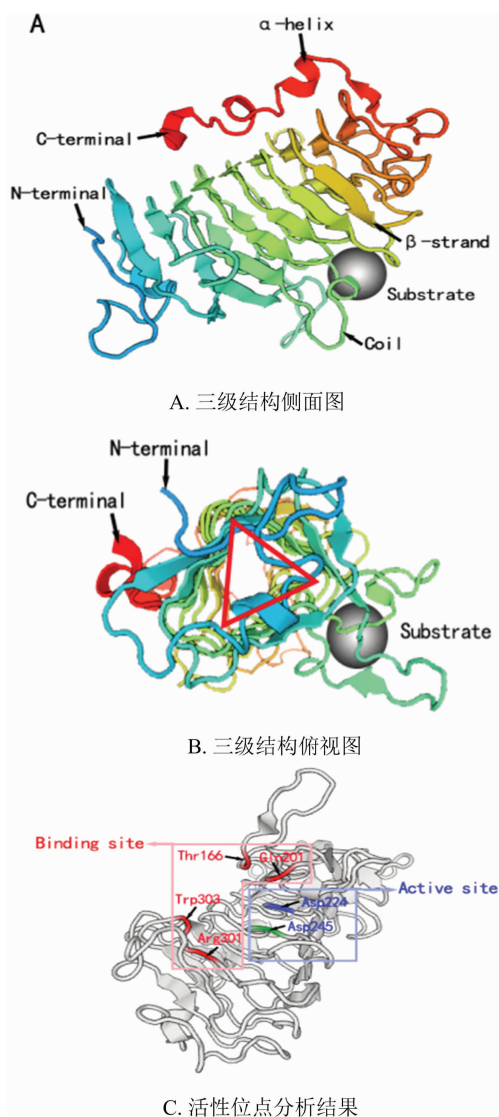


图3 枸杞果实果胶酯酶 LbPME 三级结构测序结果

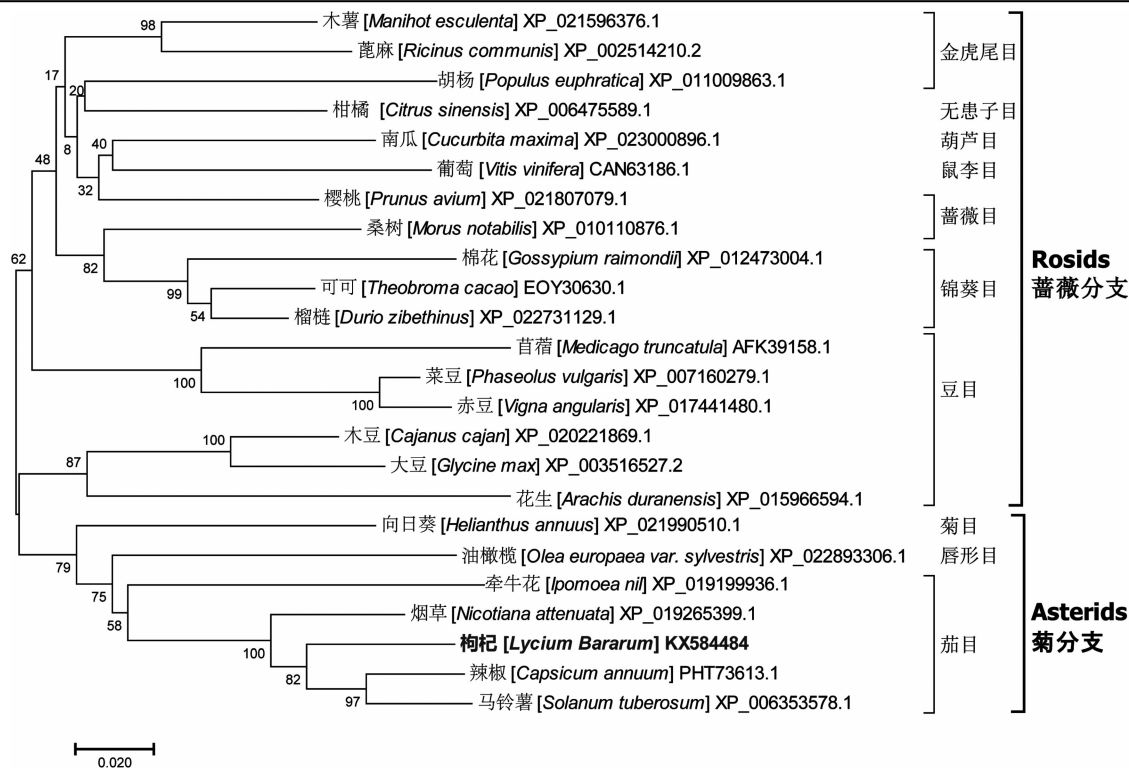
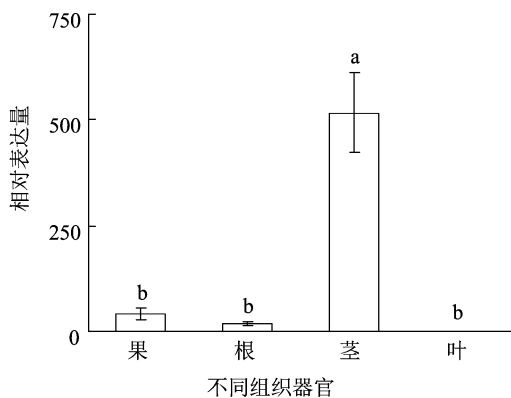
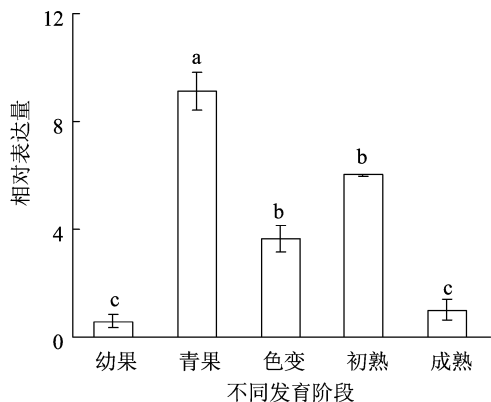


图4 枸杞和其他植物果胶酯酶蛋白系统进化树分析

A. 不同组织器官 *LbPME* 基因的表达B. 果实发育不同阶段 *LbPME* 基因的表达柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)图5 枸杞 *LbPME* 基因的表达模式

42.63 ku。而在枇杷中分离出 2 个 *EjPPME1* 和 *EjPPME2* 基因,均包含 1 个 1 737 bp 的开放阅读框 (ORF),共编码 578 个氨基酸,*EjPPME1* 理论等电点为 8.94,理论分子量为 63.05 ku,*EjPPME2* 理论等电点为 9.04,理论分子量为 63.12 ku^[16]。可见,不同植物 PME 蛋白分子存在一定差异,这可能是 PME 基因大多以基因家族的形式存在的缘故^[18-19]。进一步对枸杞 *LbPME* 蛋白的三级结构域分析发现,该蛋白具有 PME 的显著特征,由多个呈右手螺旋的 β 折叠的肽链排列而成,并且形成中空三角柱状的 PME 经典结构,这与胡萝卜、番茄的 PME 三维结构基本相似^[27-28]。

PME 是细胞壁代谢的关键酶之一,主要作用是催化植物细胞壁中的果胶去甲酯化,生成果胶酸和甲醇,进而调控植物的生长发育。PME 广泛存在于高等植物中,其表达存在时空差异特性,一些 PME 基因在整个植株的生命周期能持续表达^[29]。但也有一些 PME 基因只在植株生长发育的特定阶段或特定的组织器官中表达。在草莓上发现,*FaPE1* 仅在果实中表达,*FaPE2* 仅在叶中表达,*FaPE3-4* 在整个植株中均有表达^[15]。在本研究中,*LbPME* 在整个植株均有表达,其中,在茎中的表达量最高,在叶中的表达量最低。随着果实不断发育,果实中

LbPME 表达量呈现出先升后降变化趋势,在整个发育阶段青果期表达量最高,幼果期最低,这与草莓果实发育过程中 *PME* 基因变化趋势基本一致。这就表明 *LbPME* 在枸杞果实发育的青果期发挥重要作用,但随着果实不断发育,*LbPME* 的表达量逐渐降低,在果实成熟时维持着较低表达水平,其参与枸杞果实细胞壁成熟表达水平明显减弱,但 *LbPME* 在果实发育过程中参与果实细胞壁合成调控还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 于海伟,陈宝刚. 白桦果胶甲酯酶抑制剂 (PMEI) 基因克隆及序列分析[J]. 防护林科技,2012(1):64-67.
- [2] 龙海蓉,王齐玮,李晓平,等. 生长期和植株性别对工业大麻杆果胶含量及质量的影响[J]. 西北林学院学报,2016,31(2):244-248.
- [3] 叶 华,马 力,高秀容. 果胶酯酶的研究进展[J]. 生物学杂志,2005,22(6):5-7.
- [4] Jiang L X, Yang S L, Xie L F, et al. Vanguard1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract[J]. Plant Cell,2005,17(2):584-596.
- [5] 张 倩,鲍依群,谭小云. 拟南芥果胶甲酯化酶基因 *PME17* 在抵御丁香假单胞杆菌番茄致病变种 DC3000 株中的功能[J]. 植物生理学报,2015,51(7):1061-1066.
- [6] Wen F S, Zhu Y M, Hawes M C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development[J]. Plant Cell,1999,11(6):1129-1140.
- [7] Ren C, Kermode A R. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds[J]. Plant Physiology,2000,124(1):231-242.
- [8] Barrelt D M, Gonzalez C. Activity of softening enzymes during cherry maturation[J]. Journal of Food Science,1994,59(3):574-577.
- [9] Ruggieri V, Sacco A, Calafiore R, et al. Dissecting a QTL into candidate genes highlighted the key role of pectinesterases in regulating the ascorbic acid content in tomato fruit [J]. Plant Genome,2015,8(2):1-10.
- [10] Chen J, Chen X, Zhang Q, et al. A cold-induced pectin methyl-esterase inhibitor gene contributes negatively to freezing tolerance but positively to salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology,2018,222(8):67-78.
- [11] 李 欢,张舒怡,张 钟,等. 鲜食枣与制干枣的成熟软化机理差异研究[J]. 西北林学院学报,2017,32(5):137-143.
- [12] 叶 华. 柑橘果胶酯酶的基因克隆[D]. 成都:西华大学,2006.
- [13] 陈婷婷,李旭凯,王如意,等. 棉花 *GhPME1* 和 *GhPME2* 基因的克隆及表达分析[J]. 中国农业大学学报,2012,17(5):7-14.
- [14] Castillejo C, De La Fuente J I, Iannetta P, et al. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform[J]. Journal of Experimental Botany,2004,55(398):909-918.
- [15] 葛英亮. 樱桃蕃茄中果胶酯酶的基因克隆及在毕赤酵母中表达的初步研究[D]. 成都:西华大学,2007.
- [16] 唐佳佳. 枇杷果胶酯酶基因克隆及表达特性分析[D]. 重庆:西南大学,2014.
- [17] 张 莉,薛金爱,于浩泉,等. 调控拟南芥花瓣脱落的果胶甲酯酶基因表达和功能分析[J]. 植物生理学报,2012,48(4):350-358.
- [18] Markovic O, Janecek S. Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships[J]. Carbohydrate Research,2004,339(13):2281-2295.
- [19] Yokoyama R, Nishitani K. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis* [J]. Plant & Cell Physiology,2004,45(9):1111-1121.
- [20] Pelloux J, Rustérucchi C, Mellerowicz E J. New insights into pectin methylesterase structure and function[J]. Trends in Plant Science,2007,12(6):267-277.
- [21] Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, et al. Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta,2006,224(4):782-791.
- [22] Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho P M, et al. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses[J]. Plant Physiology,2006,140(3):946-962.
- [23] Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, et al. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) [J]. European Journal of Biochemistry,1990,193(1):183-187.
- [24] Ly-Nguyen B, Van Loey A M, Fachin D, et al. Partial purification, characterization, and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002,50(19):5437-5444.
- [25] Ricard J, Noat G. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells [J]. European Journal of Biochemistry,1986,155(1):191-197.
- [26] Versteeg C, Rombouts F M, Spaans C H, et al. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange [J]. Journal of Food Science,1980,45(4):969-971.
- [27] Johansson K, El-Ahmad M, Friemann R, et al. Crystal structure of plant pectin methylesterase [J]. FEBS Letters,2002,514(2/3):243-249.
- [28] D'Avino R, Camardella L, Christensen T M, et al. Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme [J]. Proteins,2003,53(4):830-839.
- [29] Caffè J, Tiznado M E, Handa A K. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase [J]. Plant Physiology,1997,114(4):1547-1556.