

# 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基因(DEGs)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DEGs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, *PAL*是影响木质素积累的关键基因; *SUS3*基因对纤维素的积累贡献最大, 而*BGLU*基因的下调表达也是促进纤维积累的重要因素; *GAUT6*和*SUS6*对原果胶的积累贡献最大, 但大部分*PME*基因和*PG*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*、*CCR2*、*CYP84A1*、*CYP73A12*, 以及光合途径相关基因*PSBP2*和*CAB1R*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, 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 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 *CAB1R* were important genes that affected the texture differences of two cultivars.

收稿日期: 2022-08-22

修回日期: 2022-09-22

网络出版日期:

URL:

第一作者: 张国芹, 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)

**Keywords:** 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。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%<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>, 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<sup>[4]</sup>, 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<sup>[5, 6]</sup>。木质素积累是果实木质化的主要原因<sup>[7, 8]</sup>, 而木质素的合成受苯丙烷代谢途径的相关酶调控。Liu 等<sup>[9]</sup>发现木质素合成途径中的 *EjPAL2*、*EjCAD1*、*EjCAD3*、*4CL*、*COMT* 和 *HCT* 等基因响应枇杷采后木质化过程。刘恋等<sup>[10]</sup>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主要原因。纤维素也是影响组织机械强度的重要因素, Ren 等<sup>[11]</sup>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<sup>[12]</sup>, 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<sup>[13]</sup>, 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<sup>[14]</sup>。

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’ (AT) 和 ‘Z06’ (BT) 为试验材料, 2020 年 4 月 10 日播种于苏州市农科院蔬菜所基地, 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)。于上午 9: 00~10: 00 分别收获花后 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 ℃ 冰箱以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 2 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 硬度计测定；纤维素采用硫酸蒽酮比色法测定<sup>[15]</sup>；半纤维素采用盐酸水解法测定<sup>[16]</sup>；木质素采用浓硫酸法测定<sup>[16]</sup>；可溶性果胶，原果胶采用咔唑比色法测定<sup>[17]</sup>。

## 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 Omega Plant RNA kit 试剂盒提取 RNA。对核酸样本进行琼脂糖凝胶电泳的目的是检验核酸样本的完整性；使用 NanoDrop 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<sup>TM</sup> Magnetic 试剂盒去除原核核糖体 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 提取试剂盒纯化 DNA 片段，然后对其进行末端修复、聚腺苷酸化并连接到 Illumina 测序适配器。然后通过琼脂糖凝胶电泳分离连接产物，并使用 PCR 进行扩增，在广州基迪奥生物公司使用 Illumina HiSeq<sup>TM</sup> 4000 进行测序。

## 1.5 差异基因的鉴定

通过删除包含适配器、未知“N”碱基和低质量碱基的读取，获得干净的原始数据。随后，进行气相色谱分析并计算读数的 Q20 和 Q30。使用 Trinity 软件对参考基因组进行从头转录组组装。使用 StringTie 软件计算 FPKM（每千碱基转录物片段/百万映射读取数）值，以量化单基因的表达丰度和变异。同时，使用 DESeq2 和 EdgeR 软件分析两个不同组之间 RNA 的差异表达。利用错误发现率（FDR）控制 P-value，根据差异倍数 fold change 确定差异基因（DEGs），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。每个反应体积为 20  $\mu$ L，包含 10  $\mu$ L SYBR green Master Mix、0.4  $\mu$ L 正向和反向引物以及 2  $\mu$ L cDNA。扩增条件如下：95  $^{\circ}$ C 下初始变性 30 s，然后在 95  $^{\circ}$ C 下变性 35 个周期 10 s，然后在 60  $^{\circ}$ C 下退火 30 s。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 引物序列表

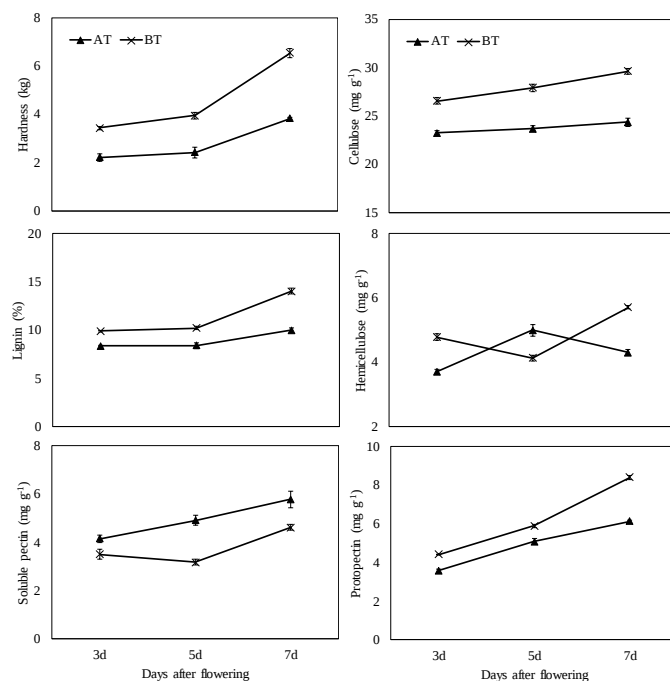
Table 1 Primer Sequence Listing

| 引物名称<br>Primer name | 序列<br>Sequence           | Tm (°C) | 扩增长度(bp)<br>Amplification length |
|---------------------|--------------------------|---------|----------------------------------|
| ACT4-FW             | GCATCTCTTAGCACCTTCCAGCAG | 59.1    | 88                               |
| ACT4-RV             | AGAAGCACTTCCTGTGGACAATGG |         |                                  |
| ASK8-FW             | CCGAAGCAGGTCAGATAA       | 60.2    | 140                              |
| ASK8-RV             | GCCACTCTCTAAGCACTT       |         |                                  |
| RVE5-FW             | GTCACAGTGGCAGTAGT        | 59.8    | 142                              |
| RVE5-RV             | CCAGGGTCAAAGACATTAC      |         |                                  |
| RPP25L-FW           | GTGAAGCCATTGACTGAG       | 59.5    | 100                              |
| RPP25L-RV           | CATAACCTCTCCCACCAT       |         |                                  |
| At1g16860-FW        | GTGCCAAGATGCGTATATG      | 60.3    | 92                               |
| At1g16860-RV        | CAGGAGAAGTAGCGATGT       |         |                                  |
| FRL4B-FW            | GCCTTGAGCAGTTAGAGA       | 59.4    | 96                               |
| FRL4B-RV            | GCATAGGACCGCCATTA        |         |                                  |
| CESA4-FW            | CGGTTACACCAAGTTCTG       | 59.7    | 111                              |
| CESA4-RV            | AAGCCTCTCAAGCCATT        |         |                                  |
| PAL-FW              | GCTAAGTGGTGAAGAAGTG      | 60      | 112                              |
| PAL-RV              | GTTCATTCTCCAGACA         |         |                                  |
| CCR1-FW             | TGAAGGAGCGAATGAGAG       | 59.7    | 110                              |
| CCR1-RV             | CAGGTGAAGCAGTATGGA       |         |                                  |
| SUS1-FW             | AATGACCTGTGGACTACC       | 60      | 107                              |
| SUS1-RV             | CTAAATCGCCGTGTGAAGG      |         |                                  |
| BGLU41-FW           | CGCCGATACTTCAAGGA        | 60      | 148                              |
| BGLU41-RV           | CGAGGAACAGATACTACCA      |         |                                  |

## 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

图 2 显示, 随黄秋葵果实发育, 两品种果实硬度逐渐升高, 且 ‘Z06’ 的硬度显著高于 ‘苏优葵 3 号’ ( $P<0.05$ )。果实中纤维素、木质素和原果胶的变化与果实硬度类似, 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% ( $P<0.05$ )。随果实发育, ‘苏优葵 3 号’ 的半纤维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, 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’ ( $P<0.05$ )。



‘优葵 3 号’ (AT), ‘Z06’ (BT), 下同

‘Suyoukui 3’ (AT), ‘Z06’ (BT), the same below

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

## 2.2 转录组数据分析

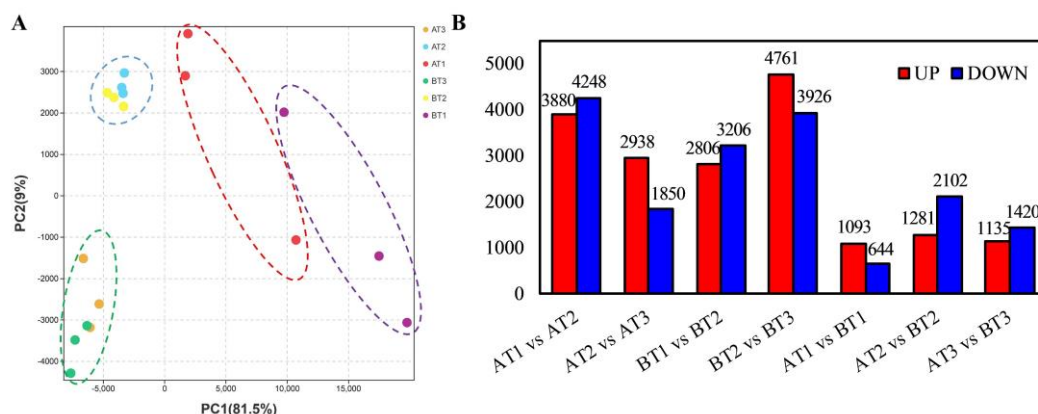
在获得原始测序读数后,评估了测序数据的质量。表 2 显示,在删除低质量的 reads 后,我们获得了 4000 万到 5500 万 CleanData。各样品中 Q20 碱基百分比均不小于 97%,样品的 GC 含量在 43.46%至 44.37%之间。测序错误率在 0.03%左右,满足后续分析要求。主成分分析 (PCA) 表明 (图 3A), AT2 与 BT2 之间差异较小,其他各处理均具有较好的重复性和差异性。

表 2 转录组数据质控表

Table 2 Transcriptome data quality control sheet

| 样品序号<br>Sample | 原始数据<br>RawDatas | 有效数据(%)<br>CleanData | 错误率(%)<br>Error rate | Q20(%) | Q30(%) | GC(%)  |
|----------------|------------------|----------------------|----------------------|--------|--------|--------|
| AT1-1          | 47 007 958       | 46 819 292           | 0.03                 | 97.53% | 93.20% | 43.99% |
| AT1-2          | 45 172 246       | 44 978 518           | 0.03                 | 97.63% | 93.41% | 43.46% |
| AT1-3          | 49 023 184       | 48 793 698           | 0.03                 | 97.44% | 93.04% | 43.97% |
| AT2-1          | 49 867 614       | 49 715 450           | 0.03                 | 97.59% | 93.29% | 43.91% |
| AT2-2          | 49 072 880       | 48 912 576           | 0.03                 | 97.62% | 93.35% | 43.96% |
| AT2-3          | 49 296 486       | 49 155 128           | 0.03                 | 97.73% | 93.58% | 43.90% |
| AT3-1          | 40 713 026       | 40 588 450           | 0.03                 | 97.71% | 93.55% | 43.71% |
| AT3-2          | 49 066 968       | 48 887 278           | 0.03                 | 97.58% | 93.27% | 43.78% |
| AT3-3          | 44 540 166       | 44 390 560           | 0.03                 | 97.58% | 93.29% | 43.78% |
| BT1-1          | 53 597 436       | 53 403 072           | 0.03                 | 97.70% | 93.49% | 43.98% |
| BT1-2          | 45 836 548       | 45 695 616           | 0.03                 | 97.66% | 93.34% | 44.22% |
| BT1-3          | 45 542 282       | 45 397 510           | 0.03                 | 97.69% | 93.47% | 44.37% |
| BT2-1          | 44 478 354       | 44 286 514           | 0.03                 | 97.56% | 93.25% | 43.67% |
| BT2-2          | 44 557 716       | 44 426 318           | 0.03                 | 97.65% | 93.41% | 43.82% |
| BT2-3          | 48 467 076       | 48 302 570           | 0.03                 | 97.61% | 93.31% | 43.88% |

|       |            |            |      |        |        |        |
|-------|------------|------------|------|--------|--------|--------|
| BT3-1 | 45 458 472 | 45 272 078 | 0.03 | 97.35% | 92.76% | 43.74% |
| BT3-2 | 47 433 318 | 47 270 036 | 0.03 | 97.57% | 93.22% | 43.78% |
| BT3-3 | 52 676 596 | 52 468 026 | 0.03 | 97.55% | 93.24% | 43.57% |



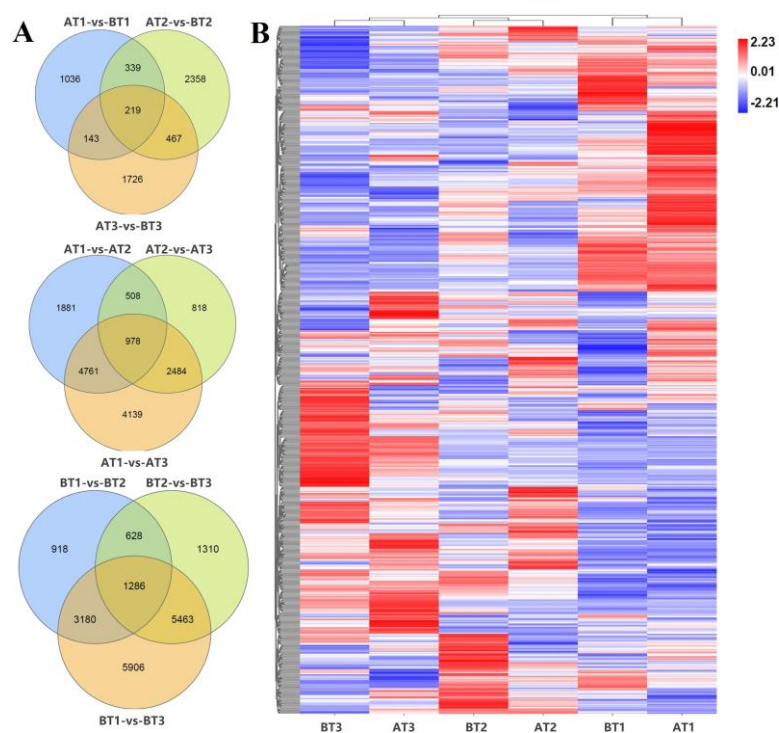
A: PCA 分布图; B: DEGs 统计分析. A 中红色为 AT1, 蓝色为 AT2, 橙色为 AT3, 紫色为 BT1, 黄色为 BT2, 绿色为 BT3  
A: PCA distribution map; B: Statistical analysis of DEGs. In Figure A, red: AT1, blue: AT2, orange: AT3, purple: BT1, yellow: BT2, green: BT3

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

## 2.3 差异基因分析

对鉴定的 DEGs 进行分类, 不同发育时期相较而言, AT 中三个比较组共有 15569 个 DEGs, BT 中共有 18691 个 DEGs; 在 AT1 vs AT2、AT2 vs AT3 和 AT1 vs AT3 中, 有 978 个共同表达的差异基因; 在 BT1 vs BT2、BT2 vs BT3 和 BT1 vs BT3 中, 有 1286 个共同表达的差异基因。两品种相较而言, 三个时期共有 6288 个 DEGs; 在 AT1 vs BT1、AT2 vs BT2 和 AT3 vs BT3 中, 有 219 个共同表达的差异基因 (图 4A)。对差异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)。在两个品种中, 花后 5 d 较花后 3 d, 下调基因数高于上调基因; 而花后 7 d 较花后 5 d, 上调基因数高于下调基因。在相同发育时期, BT 较 AT 而言, 除花后 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)。



A: 不同品种和发育时期 DEGs 表达韦恩图; B: DEGs 表达模式

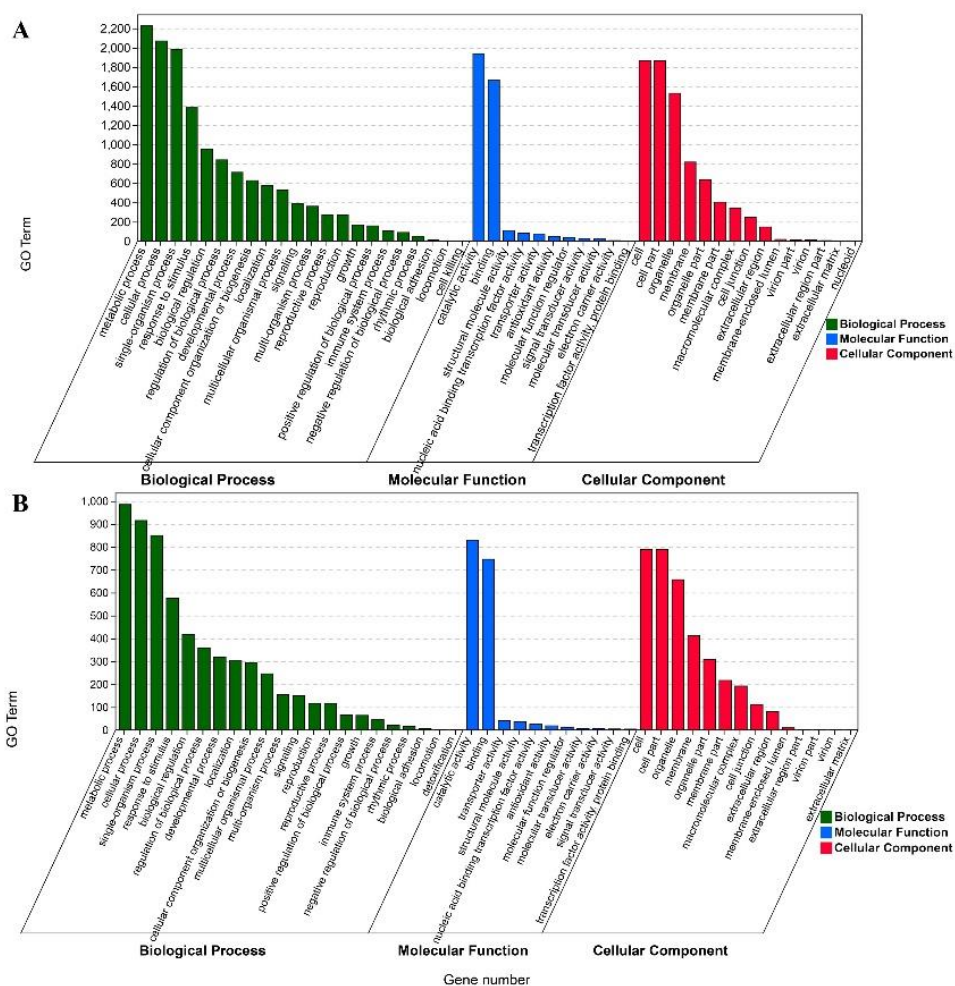
A: Venn diagram of DEGs among different combinations of samples and stages. B: Expression pattern of DEGs

图 4 韦恩图及 DEGs 表达模式

Fig.4 Venn diagram and Expression pattern of DEGs

## 2.4 差异基因的 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)。



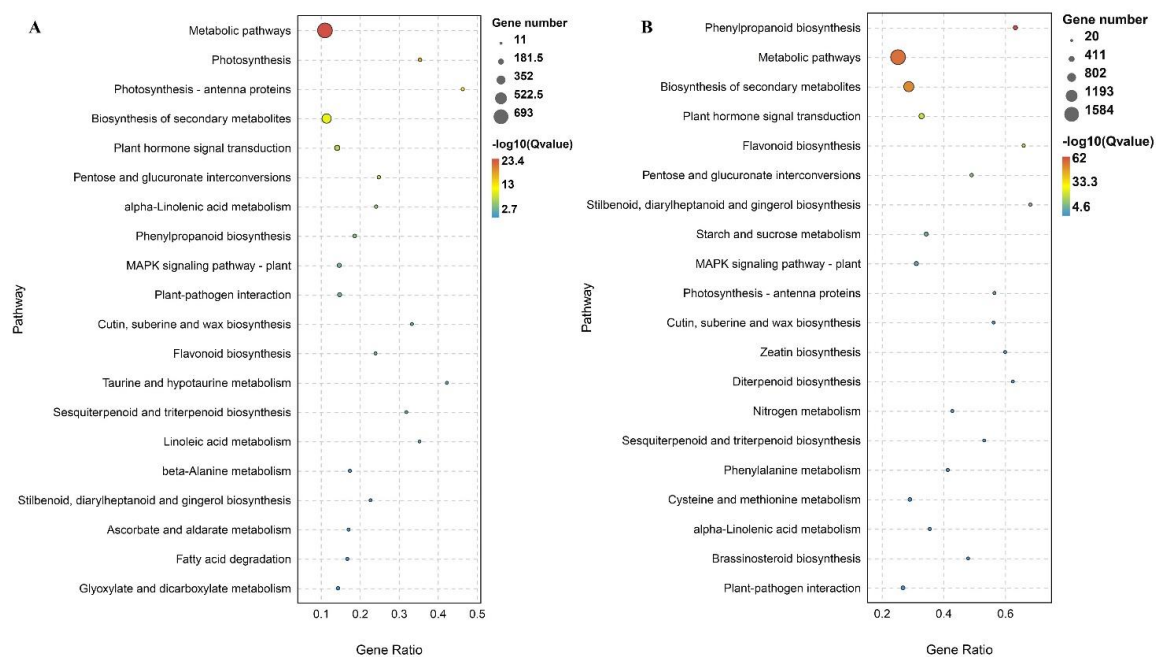
A: 不同发育时期的 DEGs; B: 不同品种的 DEGs

A: DEGs at different developmental stages; B: DEGs of different breeds

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

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，发现同一品种不同发育时期的 DEGs 主要在苯丙烷生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis) 和次级代谢产物的生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites) 显著富集；而相同时期不同品种的 DEGs 主要在光合 (Photosynthesis) 和光合作用天线蛋白 (Photosynthesis - antenna protein) 显著富集 (图 6)。



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基因分析

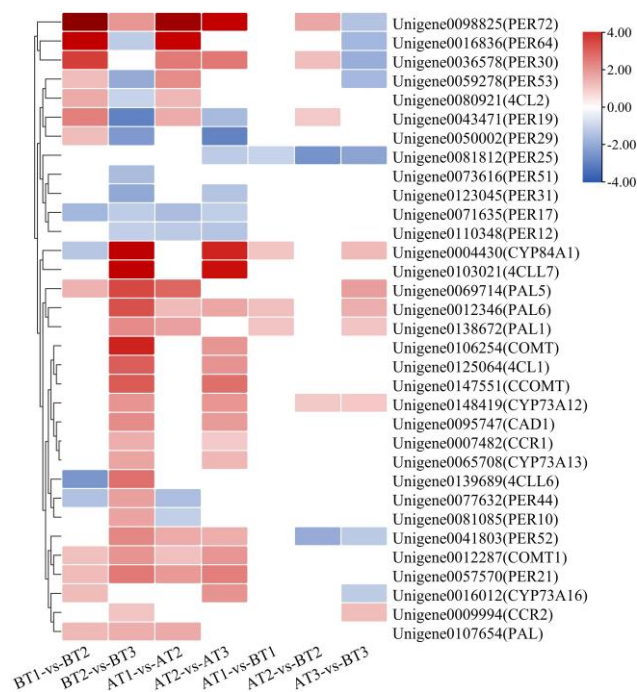


图 7 与木质素合成相关的差异基因在不同品种和发育时期的表达分析

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

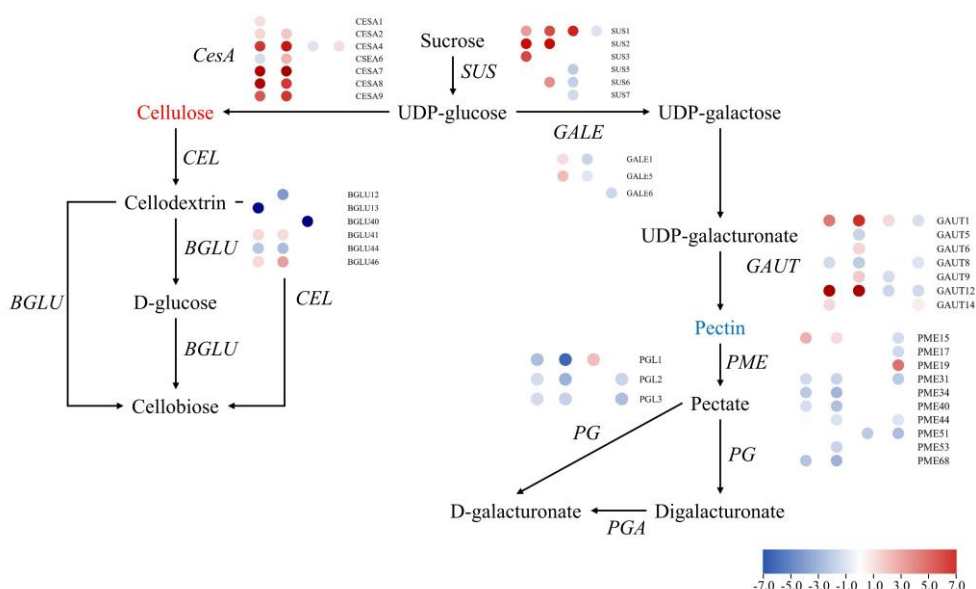
对果实发育过程与木质素合成相关的 DEGs 进行筛选, 在 AT 中共筛选到 30 个 DEGs, 在 BT 中共筛选到 32 个 DEGs。对这些 DEGs 进行聚类分析, 结果发现, 花后 7 d 较花后 5 d, *PAL6* (苯丙氨酸酶)、*CAD1*

(肉桂醇脱氢酶)、*CYP84A*、*CCR1* (肉桂酰辅酶 A 还原酶)、2 个 *COMT* (咖啡酸-O-甲基转移酶)、3 个 *CYP73A*、2 个 *4CL* (4-香豆酰-CoA 连接酶) 在 AT 中显著上调表达；在 AT1 vs AT2 中，7 个 *PER* 基因显著上调表达，4 个 *PER* 基因显著下调表达；在 AT2 vs AT3 中，4 个 *PER* 基因显著上调表达，6 个 *PER* 基因显著下调表达。在 BT 中，共有 21 个基因在 BT2 vs BT3 中显著上调表达 (包括 *PAL*、*CAD*、*CCR*、*COMT*、*CYP73A*、*CYP84A* 和部分 *4CL*、*PER* 基因)；在 BT2 vs BT3 中 *4CL1*、*4CL6*、*4CL7* 显著上调表达，而 *4CL2* 显著下调表达；在 BT1 vs BT2 中，7 个 *PER* 基因显著上调表达，2 个 *PER* 基因显著下调表达；在 BT2 vs BT3 中，5 个 *PER* 基因显著上调表达，5 个 *PER* 基因显著下调表达 (图 7)。

两品种相比较而言，木质素合成相关 DEGs 在不同时期差异较大，花后 3 d，两品种间共有 4 个差异表达的基因，BT 较 AT 显著上调表达的基因有 *CYP84A1*、*PAL6* 和 *PAL1*，仅 *PER25* 显著下调表达；花后 5 d，共有 6 个差异表达的基因，BT 较 AT 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*)；花后 7 d，两品种间的 DEGs 数最多，共有 13 个，BT 较 AT 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基因分析

对纤维素和果胶合成代谢相关的 DEGs 进行筛选并分析，结果发现，花后 7 d 较花后 5 d，两品种各有 6 个纤维素合成基因 (*CesA*) 显著上调表达；*CesA4* 基因在 AT2 vs BT2 中显著下调表达，但在 AT3 vs BT3 中上调表达。 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (*BGLU*) 作为纤维素酶家族，花后 7 d 较花后 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，花后 5 d 有 1 个 *BGLU* 显著下调表达。*SUS* (纤维素合成酶) 在纤维素合成过程起重要作用，花后 7 d 较花后 5 d，两品种各有 3 个 *SUS* 基因显著上调表达；而在 AT2 vs BT2 中，仅 *SUS1* 显著上调表达，*SUS5*、*SUS6*、*SUS7* 均显著下调表达，在 AT3 vs BT3 中，仅 *SUS1* 显著下调表达 (图 8)。



基因表达自左往右的四列分别代表 AT2 vs AT3、BT2 vs BT3、AT2 vs BT2 和 AT3 vs BT3。彩色圆形符号表示该基因在此比较组显著差异表达  
The four columns of gene expression represent AT2 vs AT3, BT2 vs BT3, AT2 vs BT2 and AT3 vs BT3. Colored circle symbol indicates that the gene is significantly different expressed in this comparison group

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

花后 7 d 较花后 5 d, 参与果胶合成的半乳糖醛酸转移酶基因 (*GAUT1*、*GAUT12*、*GAUT14*) 在 AT 中表达量显著升高, *GAUT1*、*GAUT6*、*GAUT9*、*GAUT12* 在 BT 中表达量显著升高, 而 *GAUT8* 基因在 AT 中下调表达, *GAUT5* 和 *GAUT8* 在 BT 中下调表达; 在花后 5 d 和花后 7 d, AT vs BT 各有一个显著上调表达的 *GAUT* 基因, 而 AT2 vs BT2 有 2 个下调 *GAUT* 基因, AT3 vs BT3 有 3 个下调 *GAUT* 基因。花后 7 d 较花后 5 d, 2 个 UDP 阿拉伯糖 4-差异构酶 (*GALE*) 基因在 BT 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, 花后 7 d 较花后 5 d, *PEM15* 在 AT 和 BT 中均显著上调表达, 但 4 个 *PEM* 基因在 AT 中显著下调表达, 6 个 *PEM* 基因在 BT 中显著下调表达; 在 AT2 vs BT2 中 *PME51* 下调表达, 而在 AT3 vs BT3 中, 除 *PME19* 显著上调表达外, 5 个 *PEM* 基因显著下调表达。两品种在花后 7 d 有 3 个聚半乳糖醛酸酶基因 (*PG*) 均显著下调表达; 而在 AT2 vs BT2 中, *PG1* 上调表达, 在 AT2 vs BT2 中, *PG2*、*PG3* 下调表达 (图 8)。

## 2.7 与光合作用和天线蛋白相关的差异基因分析

表 3 显示了相同时期两品种相较而言与光合作用相关的 DEGs 表达情况。在花后 3 天, 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 BT 中均上调表达。在花后 5 天, 有 6 个光合途径相关基因在 BT 中显著上调, 有 5 个基因在 BT 中显著下调; 4 个与光合天线蛋白途径相关的 DEGs 在 BT 中均显著上调。在花后 7 天, 仅有 *psbB* 一个差异基因在 BT 中显著上调表达。

表 3 两品种与光合作用和天线蛋白相关 DEGs 分析

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

| 基因名称         | log <sub>2</sub> FC (AT1 vs BT1) | log <sub>2</sub> FC (AT2 vs BT2) | log <sub>2</sub> FC (AT3 vs BT3) | 基因描述                     |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 光合作用途径       |                                  |                                  |                                  |                          |
| <i>atpF</i>  | —                                | 1.03                             | —                                | ATP 合成酶 CF0 亚基           |
| <i>atpB</i>  | 1.06                             | -2.20                            | —                                | ATP 合成酶 CF1 $\beta$ 亚基   |
| <i>ATPC</i>  | 1.76                             | —                                | —                                | ATP 合酶 $\gamma$ 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 <i>psaK</i> |
| <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            |
| 光合天线蛋白途径       |      |       |      |                       |
| <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        |

注：表中正值为上调表达，负值为下调表达，横线表示没有显著差异

Note: The positive value is up-regulated expression, the negative value is down-regulated expression, and the horizontal line indicates no significant difference

## 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。

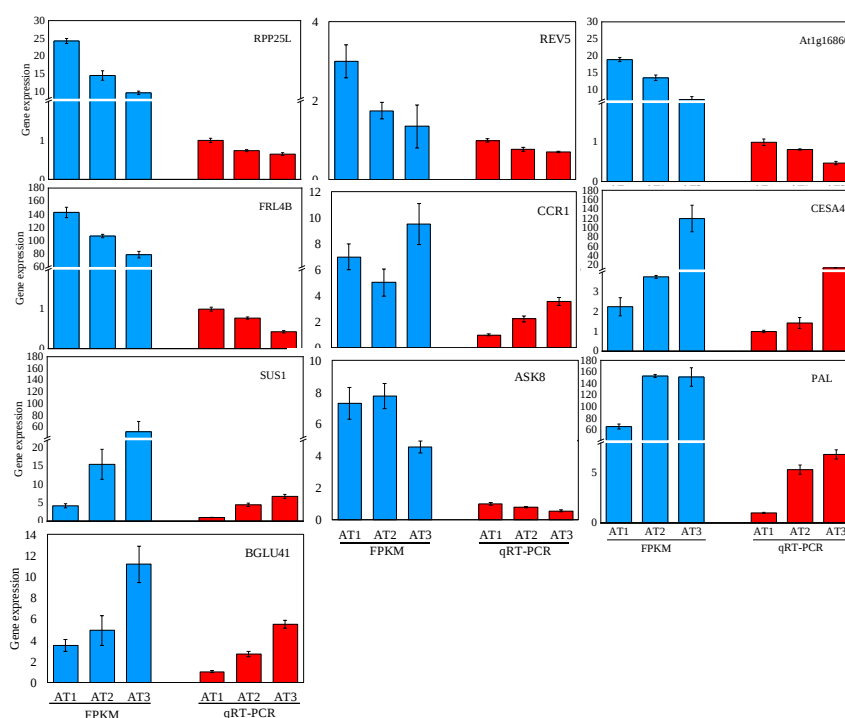


图 9 差异表达基因的 qRT PCR 验证

Fig. 9 qRT PCR validation of differentially expressed genes

## 2.9 果实质地变硬的关键因素分析

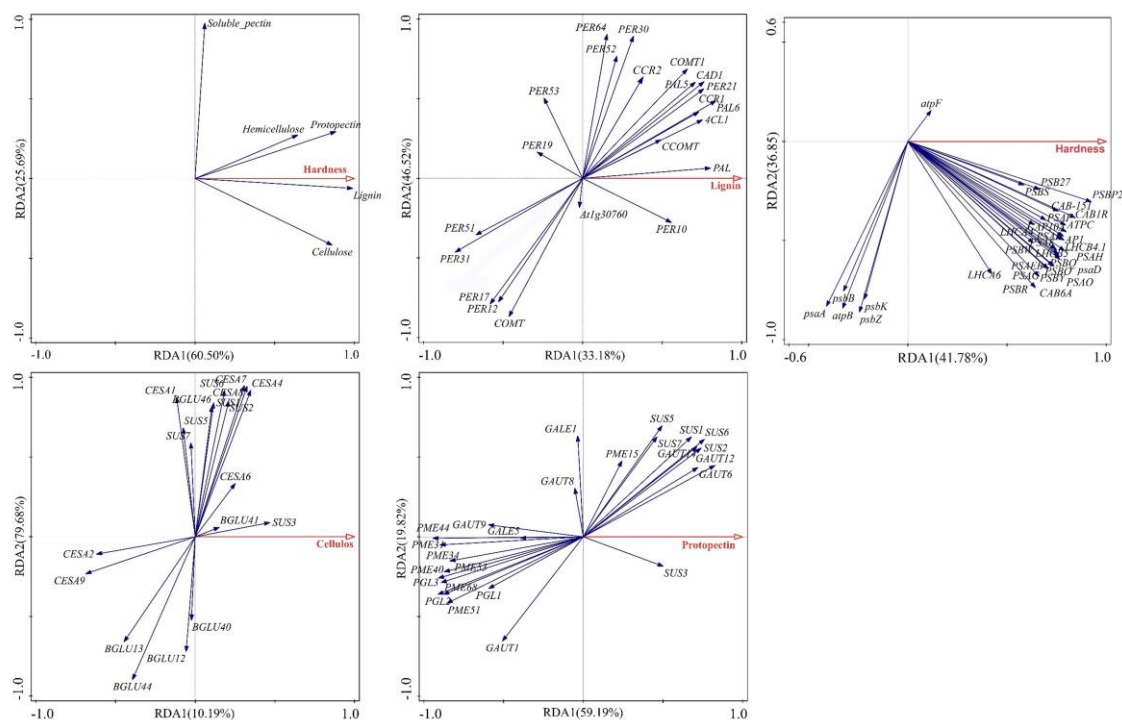


图 10 RDA 分析影响质地的关键因素

Fig. 10 RDA analysis of key factors affecting texture

冗余分析 (RDA) 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 和 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最大, 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 对硬度的贡献最高, 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。

## 3 讨论

RNA-seq 是探究植物发育分子机制的重要手段<sup>[18]</sup>, 广泛应用于产品器官质地变化的机理研究<sup>[19]</sup>。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, 差异基因主要在苯丙烷生物合成途径富集, Wang 等<sup>[20]</sup>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<sup>[21]</sup>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* 对硬度的贡献最高。Ifuku 等<sup>[22]</sup>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<sup>[23]</sup>, 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。

细胞壁结构是影响果实质地的重要因素<sup>[24]</sup>。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<sup>[20]</sup>, 但降低愈伤组织弹性<sup>[25]</sup>。*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<sup>[26]</sup>。Lu 等<sup>[27]</sup>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<sup>[28]</sup>, 且 *CCR* 的表达与木质素含量呈显著正相关<sup>[29]</sup>。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<sup>[30]</sup>。*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<sup>[31]</sup>, 本研究中两品种的 *4CL1* 在花后 7 d 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<sup>[32]</sup>, 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<sup>[33]</sup>, 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。

本研究中, 纤维素对果实硬度也呈正贡献。李永平等<sup>[34]</sup>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<sup>[35]</sup>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<sup>[36]</sup>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<sup>[37]</sup>, 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<sup>[38]</sup>。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<sup>[39]</sup>, 且 Koziol 等<sup>[40]</sup>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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。本研究中, *GAUT6* 对原果胶的贡献最高, 其次为 *SUS6* 和 *SUS2*, Biswal 等<sup>[41]</sup>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。Gwanpu 等<sup>[42]</sup>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基因也起到关键作用。*PSBP2* 和 *CAB1R* 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品种木质素合成, 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] FAO. <https://www.fao.org/faostat>. 2022.
- [2] Singh P, Chauhan V, Tiwari BK, Chauhan SS, 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.
- [3] 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. 浙江大学, 博士学位论文, 2021.  
Huang WN. Mechanism study on the lignin accumulation in lignified cells and cell-wall dynamic of pectin in postharvest loquat fruit. Zhejiang university, (PhD dissertation), 2021.
- [4] Goulao LF, Oliveira CM. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19:4-25.
- [5] Ren YY, Huang DD, Liu SW, Zhao FY, Yu K, Zhu SH. Sodium hydrosulfide delays the softening of fig fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 2022, 299: 111037.
- [6] Wang DD, Yeats TH, Uluisik S, Rose JKC, Seymour GB. Fruit softening: revisiting the role of pectin. *Trends in Plant Science*, 2018, 23:302-310.
- [7] 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, 31:579-583.  
Liu J, Cheng Y, Peng S. The relationship between changes of cell wall components, ectin-degradingenzyme activity and texture of postharvest pear fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31: 579-583.
- [8] 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 Chem (Oxf)*, 2022, 5:100117.
- [9] Liu WL, Zhang J, Jiao C, Yin XR, Fei ZJ, Wu QB, Chen KS. Transcriptome analysis provides insights into the regulation of metabolic processes during postharvest cold storage of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruit. *Horticulture Research*, 2019, 6: 49.
- [10] 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, 54:4421-4433.  
Liu L, Tang Z, Li F, Xiong J, Lv B, Ma X, Tang C, Li Z, Zhou L, Lu X. Fruit quality in storage, storability and peel transcriptome analysis of Rong'an Kumquat, Huapi Kumquat and Cuimi Kumquat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54: 4421-4433.
- [11] Ren J, Wang JR, Gao MY, 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.
- [12] 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.
- [13] Wang Y, Zhang XF, Yang SL, Yuan YB. 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.
- [14] Defilippi BG, Ejsmentewicz T, Covarrubias MP, 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.
- [15] 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 XK. Plant physiological and biochemical experiment principle and technology. Higher education p. Beijing, 2006.
- [16] 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*, 2005:40-41.  
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.

- [17] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导: 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. China Light Industry Press: Beijing, China, 2007.
- [18] Martin LBB, Fei ZJ, Giovannoni JJ, Rose JKC. Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 66.
- [19] Gao Y, Guo Y, Su ZY, Yu Y, Zhu ZC, Gao P, Wang XZ. Transcriptome analysis of genes related to fruit texture in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109075.
- [20] 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, 23:527-540.
- Zhao Y, Chen S, You L, Han R, Zhai J, Ren H, Wu S. Identification and analysis lignin biosynthesis genes of *Averrhoa carambola*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23: 527-540.
- [21] Chen BL, Yang HK, Ma YN, Liu JR, Lv FJ, Chen J, Meng YL, Wang YH, Zhou ZG. Effect of shading on yield, fiber quality and physiological characteristics of cotton subtending leaves on different fruiting positions. *Photosynthetica*, 2017, 55:240-250.
- [22] Ifuku K, Yamamoto Y, Ono T-a, 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.
- [23] Wang Y, Zhang XF, Yang SL, Yuan YB. 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.
- [24] Cybulska J, Zdunek A, Psonka-Antonczyk KM, Stokke BT. The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92:128-137.
- [25] Wang B, Li ZC, Han ZH, Xue SL, 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.
- [26] Begovic L, Abicic I, Lalic A, Lepedus H, Cesar V, Leljak-Levanic D. Lignin synthesis and accumulation in barley cultivars differing in their resistance to lodging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 133:142-148.
- [27] Lu JN, Shi YZ, Li WJ, Chen S, Wang YF, He XL, Yin XG. RcPAL, a key gene in lignin biosynthesis in *Ricinus communis* L. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 1-11.
- [28] Park HL, Bhoo SH, Kwon M, Lee SW, Cho MH. Biochemical and expression analyses of the rice Cinnamoyl-CoA reductase gene family. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2099.
- [29] Chanoca A, de Vries L, Boerjan W. Lignin engineering in forest trees. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10.
- [30] De Meester B, Calderon BM, de Vries L, Pollier J, Goeminne G, Van Doorselaere J, Chen MJ, Ralph J, Vanholme R, Boerjan W. Tailoring poplar lignin without yield penalty by combining a null and haploinsufficient CINAMOYL-CoA REDUCTASE2 allele. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-13.
- [31] Gui JS, Luo LF, Zhong Y, Sun JY, Umezawa T, Li LG. 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.
- [32] Ma DM, Xu C, Alejos-Gonzalez F, Wang H, Yang JF, Judd R, Xie DY. Overexpression of *artemisia annua* cinnamyl alcohol dehydrogenase increases lignin and coumarin and reduces artemisinin and other sesquiterpenes. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 828.
- [33] Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60:367-76.
- [34] 李永平, 陈敏甄, 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, 49:73-85.
- Li Y, Chen M, Liu J, Zeng M, Zhu H, Wen Q. Identification and expression analysis of CESA gene family in *Hibiscus esculentus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49: 73-85.
- [35] 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.
- [36] Coleman HD, Yan J, Mansfield SD. 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, 106:13118-23.
- [37] Nawaz MA, Lin X, Chan TF, Imtiaz M, Rehman HM, Ali MA, Baloch FS, Atif RM, Yang SH, Chung G. Characterization of cellulose synthase A (CESA) gene family in eudicots. *Biochemical Genetics*, 2019, 57:248-272.
- [38] Xiao Y, Yi F, Ling JJ, Wang Z, Zhao K, Lu N, Qu GZ, Kong LS, Ma WJ, Wang JH. 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.
- [39] Lopez-Sanchez P, Martinez-Sanz M, Bonilla MR, Sonni F, Gilbert EP, Gidley MJ. Nanostructure and poroviscoelasticity in cell wall materials from onion, carrot and apple: Roles of pectin. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105253.
- [40] Koziol A, Cybulska J, Pieczywek PM, Zdunek A. Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 161:197-207.
- [41] Biswal AK, Hao ZY, Pattathil S, Yang XH, Winkeler K, Collins C, Mohanty SS, Richardson EA, Gelineo-Albersheim I, Hunt K, Ryno D, Sykes RW, Turner GB, Ziebell A, Gjersing E, Lukowitz WG, Davis MF, Decker SR, Hahn MG, 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.
- [42] Gwanpua SG, Mellidou I, Boeckx J, Kiyomugasho C, Bessemans N, Verlinden BE, Hertog MLATM, Hendrickx M, Nicolai BM, Geeraerd AH. 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.

