

草莓 β -半乳糖苷酶基因 *FaT β gal* 的克隆与表达分析

周厚成^{1,2}, 李 刚¹, 赵 霞¹, 郭蔼光²

(1 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 利用 SSH 和 RACE 技术, 从‘丰香’草莓果实中分离了 1 个草莓 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 基因, 命名为 *FaT β gal*。 *FaT β gal* 基因 cDNA 序列全长 2 891 bp, ORF 区 2 448 bp, 编码 815 个氨基酸, 含有保守序列 GGPIILSQUIENEY 和凝集素结构域。 *FaT β gal* 推导氨基酸序列与已报道的 3 个草莓 β -Gal 基因 *Fa β gal1*(CAC44500)、*Fa β gal2*(CAC44501)、*Fa β gal3*(CAC44502) 氨基酸序列有 47.1%~48.1% 的相似性。与其它物种 24 个 β -Gal 基因聚类分析表明, *FaT β gal* 聚在一个独立的分枝上。采用实时荧光定量 PCR 技术, 对 *FaT β gal* 基因在果实发育成熟过程中的表达分析表明, 该基因在果实中特异表达, 随着果实成熟表达量升高, 粉红期达到峰值, 全红期迅速下降; 2 个软硬不同的品种表达模式趋于一致。研究认为, *FaT β gal* 基因是 β -Gal 基因家族的一个新基因, 该基因可能在果实成熟软化过程中发挥作用。

关键词: 草莓; β -半乳糖苷酶基因; 基因表达; 果实成熟与软化

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *FaT β gal* of β -Galactosidase Family from *Fragaria ananassa* Fruit

ZHOU Houcheng^{1,2}, LI Gang¹, ZHAO Xia¹, GUO Aiguang²

(1 Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China; 2 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To identify the function of β -galactosidase (β -Gal) gene during ripening and softening, we isolated a β -Gal gene, named *FaT β gal*, from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch. cv Toyonoka) by suppression subtraction hybridization (SSH) and RACE techniques. The full length cDNA sequence of the *FaT β gal* gene is 2 891 bp and the open reading frame (ORF) is 2 448 bp which encoded a deduced protein including 815 amino acid residues. The *FaT β gal* protein is a member of the β -Gal gene family of glycoside hydrolase family 35 members, including conservative base sequence “GGPIILSQUIENEY” and a galactose binding lectin domain. Blastp analysis revealed 47.1% to 48.1% similarities between *FaT β gal* and three reported *F. ananassa* genes of *Fa β gal1*(CAC44500), *Fa β gal2*(CAC44501) and *Fa β gal3*(CAC44502). Phylogenetic analysis showed that *FaT β gal* was clustered on one independent branch with 24 β -Gal genes of other species. The relative expression of *FaT β gal* was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) during ripening and softening. The results showed that *FaT β gal* gene was expressed specifically at the mature stage of fruits, and the relative expression levels of *FaT β gal* genes increased rapidly with fruit ripening and reached a peak at the pink stage, then markedly declined at red fruit stage. The trends of β -Gal expression in two cultivars of Toyonoka and Sweet Charlie were similar during fruit development and ripening. These results indicated that the *FaT β gal* is a novel gene of the β -Gal gene family, and may play

收稿日期: 2015-08-31; 修改稿收到日期: 2015-10-28

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2015-ZFRI-03); 河南省基础与前沿技术项目(132300410034)

作者简介: 周厚成(1974—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事草莓遗传育种研究。E-mail: zhouhoucheng@caas.cn

an important role in strawberry fruit ripening and softening.

Key words: *Fragaria ananassa*; strawberry; β -galactosidase gene; gene expression; fruit ripening and softening

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)主要作用底物是细胞壁中具有半乳糖残基支链的木葡聚糖(xyloglucan)和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 I (rhamnogalacturonan I, RG I), β -Gal 通过降解细胞壁果胶多糖侧链上的 β -半乳糖,使细胞组分变得不稳定,导致细胞壁结构破坏,从而引起果实软化^[1]。在高等植物中, β -Gal 是唯一具有水解内切 β -1,4-半乳糖能力的糖苷酶^[2-3]。 β -Gal 根据其表达部位、活性变化可被分为 β -Gal I、 β -Gal II、 β -Gal III 等 3 种同工酶,它们水解果胶的能力不同, β -Gal II 水解果胶的作用最强,其次是 β -Gal III 和 β -Gal I^[4],这 3 种酶在果实成熟和软化过程中活性变化不一样^[5-8]。

β -Gal 基因家族内的部分基因参与果实的成熟软化进程。在番茄果实中有 7 个 β -Gal (*TBG*) 基因编码 β -Gal II,其中 6 个在果实成熟过程中表达^[9],但只有 *TBG4* 在果实成熟软化过程中起作用。在砂梨中有 7 个 β -Gal 基因 *PpGAL1*~*PpGAL7*,它们在果实发育成熟过程中的表达模式不一样^[10]。另外,在番木瓜^[4,11]、香蕉^[12]、枣^[13]、苦瓜^[14]等果实中分离出与软化相关的 β -Gal 基因。 β -Gal 在草莓成熟软化过程中起作用^[15-17],Trainotti 等^[18]从草莓果实中分离了 3 个 β -Gal 基因,其中仅有 *Fa β gal1* 的表达量在果实成熟阶段显著增加,而 *Fa β gal2*、*Fa β gal3* 在果实成熟阶段几乎检测不到表达量。草莓 β -Gal 基因为多基因家族,更多的草莓 β -Gal 基因需要分离和功能验证,其对果实成熟软化的作用仍需进一步研究。

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)是非呼吸跃变型果实,其成熟软化机制仍不明确,导致果实成熟软化的关键酶和基因还存在争议,研究表明果实软化与细胞壁降解酶包括 β -Gal 酶密切相关^[19-21]。本试验从已构建的草莓果实抑制差减杂交(SSH)cDNA 文库中获得 β -Gal 基因 EST 序列,利用 RACE 技术分离了一个新的 β -Gal 基因 cDNA 全长,并进行了表达分析,旨在从分子水平阐明 β -Gal 在草莓果实成熟软化过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料取自中国农业科学院郑州果树研究所草莓种植温室,草莓植株正常肥水管理。3 月份取

草莓‘丰香’(*Fragaria ananassa* cv. Toyonoka)粉红期果实提取总 RNA 用于基因克隆;取‘丰香’和‘甜查理’(*F. ananassa*, cv. Sweet Charlie)2 个品种小绿果期、大绿果期、白果期、粉红果期和红果期 5 个不同时期的果实,以及根、叶、花等植株组织用于基因表达分析,材料液氮速冻置于-80℃保存。

1.2 基因克隆

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 果实总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂盒操作手册进行。以提取的总 RNA 为模板,按照 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 的基本操作流程合成 cDNA。失活反转录酶后,用灭菌超纯水稀释 50 倍,-20℃保存备用。

1.2.2 cDNA 末端扩增 以 cDNA 为模板,使用 Clontech SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 扩增 3' 和 5' 末端。根据已构建的 SSH 文库中 β -Gal 基因 EST 序列 C32-5^[22] 设计 3' 端特异引物(GSP- β -gal3),参照森林草莓(*F. vesca*)基因组序列(NCBI 登录号 XM_004292664)设计 5' 端特异引物(GSP- β -gal5),中间片段扩增引物(β -gal-F1 与 β -gal-R1、 β -gal-F2 与 β -gal-R2),由上海生工合成,引物序列见表 1,UPM 为长引物(45 bp,0.4 μ mol/L)和短引物(22 bp,2 μ mol/L)混合而成。

PCR 扩增反应体系为 50 μ L,包含 2 $\times$ Taq PCR master Mix 25 μ L,H₂O 20 μ L,cDNA 1 μ L,UPM 2 μ L,GSP- β -gal5(或 GSP- β -gal3)2 μ L;反应程序为:94℃预变性 10 min;94℃变性 30 s,65℃

表 1 基因克隆和表达分析所用引物

Table 1 Sequence of the primers used in the gene cloning and expression analysis

编号 Code		序列 Sequence(5'→3')
GSP- β -gal5		ACCAAACCGGAAAACCA
GSP- β -gal3		CCAACAGCGAACTCAGGTGTCCTC
UPM	Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT
	Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
β -gal-F1		TGATAATCGACGGTCAGCAT
β -gal-R1		AAATTGACAACGGTTTGCTCT
β -gal-F2		GGGTATGCCAAATGAACCAA
β -gal-R2		CCAGTATCGACCAATGCTT
FaActin-F		CGAGGCTCAATCCAAAAGAG
FaActin-R		TGGCCACATACATAGCAGGA
β -gal-F3		AGAGTGAATGGACTTATGGTGGTT
β -gal-R3		TACTATTTTGTCTGTAAACCTCTGC

退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后回收目标片段, 利用 pUCm-T 载体进行 T/A 克隆, DNA 测序由上海生工生物技术有限公司完成。

1.3 β -Gal 基因系统进化树构建

用克隆的 *FaT β gal* 基因推导的氨基酸序列和 NCBI 下载的 β -Gal 序列采用 MEGA 5.05 软件邻接法(NJ)模型, 构建 β -Gal 系统进化树。

1.4 荧光定量 PCR 分析 β -Gal 基因表达

以草莓持家基因 *FaActin* 为内参进行 qRT-PCR, 设计 *FaActin* 扩增引物 FaActin-F 和 FaActin-R, 以 C32-080 序列为模板, 设计 β -Gal 扩增引物 β -gal-F3 和 β -gal-R3, 序列见表 1。参照文献[22]的方法检测 β -Gal 基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 β -Gal 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

利用 RACE 方法, 使用通用引物 UPM 和特异引物 GSP- β -gal5 对反转录合成的 cDNA 进行 PCR 扩增得到 5' 端序列, 经克隆测序去除引物接头后得到长度为 655 bp 的序列。引物 UPM 和 GSP- β -gal3 扩增测序得到长度为 430 bp 的 3' 端序列, 末端有 32 个 polyA。另外, 分别以合成的 cDNA 为模板用引物 β -gal-F1 与 β -gal-R1、 β -gal-F2 与 β -gal-R2 进行 PCR 扩增得到 961 和 984 bp 的 2 条序列。将克隆获得的 5' 端、3' 端、中间序列以及 C32-080 序列(该序列长 658 bp), 通过 DNAMAN 和 Blast 软件进行拼接分析, 获得草莓果实 β -Gal 基因 cDNA 序

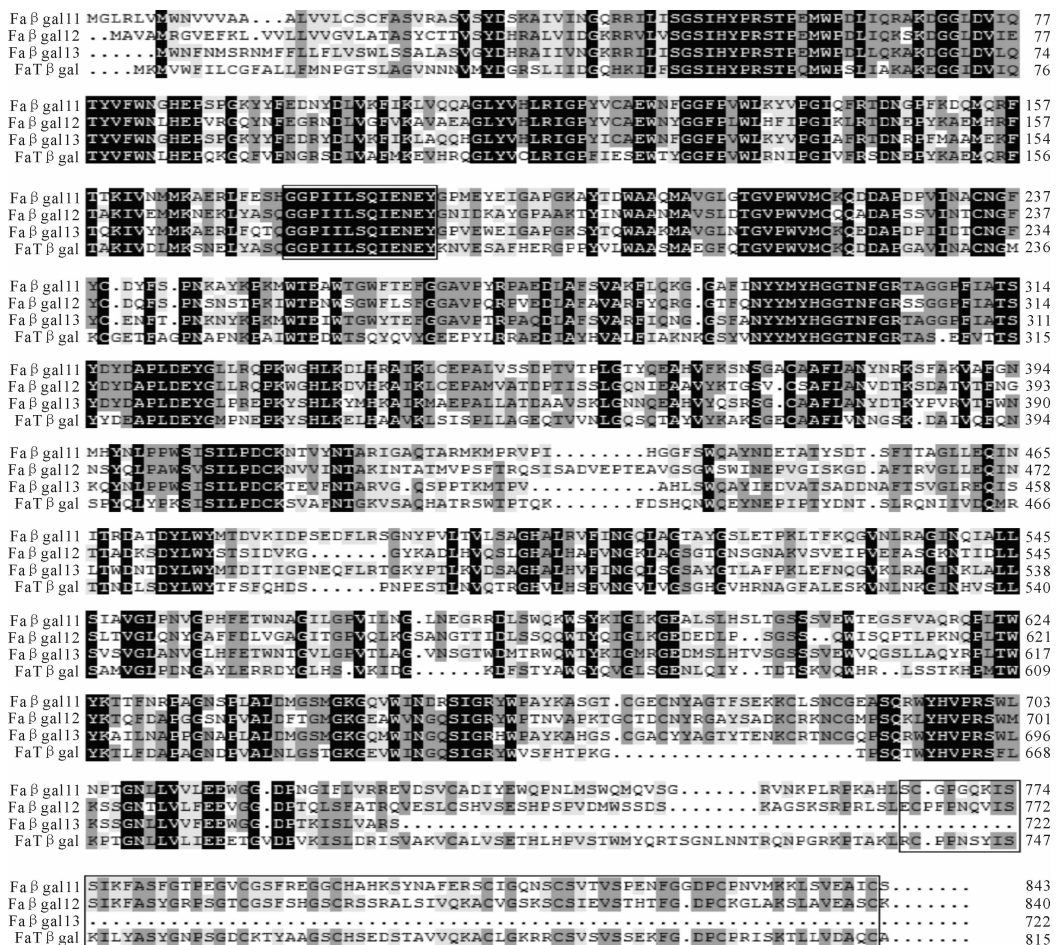


图1 草莓 β -Gal 基因氨基酸序列相似性比较

方框内分别为糖基水解酶家族 35 基序和半乳糖结合的凝集素结构域, 灰色区域为部分共有氨基酸残基, 黑色区域为全部共有氨基酸残基; Fa β gal1. 草莓(CAC44500); Fa β gal2. 草莓(CAC44501); Fa β gal3. 草莓(CAC44502)

Fig. 1 Alignment of deduced amino acid sequences of *FaT β gal* gene with those of the other strawberry β -Gal genes

The frames show Glycoside hydrolase family 35 motif and Galactose binding lectin domain, respectively. Grey area shows shared amino acid residues of partial β -Gal. Black area shows shared amino acid residues of all β -Gal.

Fa β gal1. *F. ananassa* (CAC44500); Fa β gal2. *F. ananassa* (CAC44501); Fa β gal3. *F. ananassa* (CAC44502)

列全长。该序列长 2 891 bp,含有一个 2 448 bp 的完整 ORF(255~2702 位),推导编码 815 个氨基酸(图 1)。该基因命名为 *FaTβgal*,将 *FaTβgal* cDNA ORF 序列在森林草莓基因组数据库(<http://www.phytozome.net/>)中进行 Blastn,结果表明,*FaTβgal* 与基因 *mrna11229.1-v1.0-hybrid* 匹配。*mrna11229.1-v1.0-hybrid* 位于 2 号染色体上,基因全长 6 603 bp,由 20 个外显子和 19 个内含子组成,编码区 2 748 bp,编码 915 个氨基酸。

在 NCBI 中进行 Blast 分析,*FaTβgal* 与森林草莓基因组预测的 β -Gal 16 mRNA 序列(XM_004292664)相似性为 99%,而与其它 β -Gal 基因的核苷酸序列相似性很低。同样,*FaTβgal* 推导的氨基酸序列与森林草莓 β -Gal 16-like 蛋白(XP_

004292712)有 99%的相似性,而与来源于栽培品种的 3 个 β -Gal 基因 *Faβgal1*、*Faβgal2*、*Faβgal3* 相似性仅为 47.1%~48.1%。与其它物种 β -Gal 蛋白的氨基酸序列相似性为 60%左右。序列进一步分析表明 *FaTβgal* 属于糖基水解酶的 35 家族(glycoside hydrolase family 35)的成员,包含保守序列 GGPI-ILSQIENEY 和位于第 738~814 个氨基酸之间含有 7 个保守的半胱氨酸残基(C)的半乳糖结合的凝集素结构域(图 1)。

2.2 *FaTβgal* 系统聚类分析

选取草莓 3 个 β -Gal 基因 *Faβgal1*、*Faβgal2*、*Faβgal3*,番茄(*Solanum lycopersicum*)7 个 β -Gal 基因 *TBG1*~7,砂梨(*Pyrus pyrifolia*)7 个 β -Gal 基因 *PpGAL1*~7、番木瓜(*Carica papaya*)3 个 β -

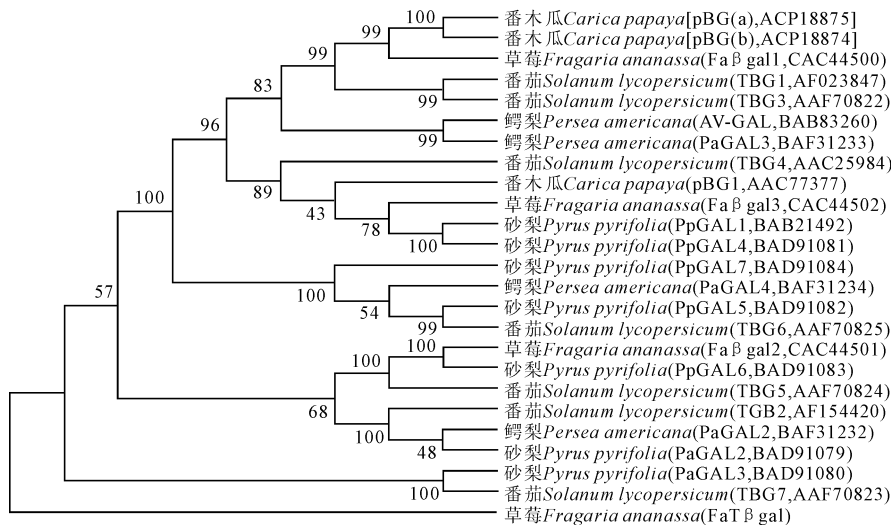


图 2 草莓 *FaTβgal* 与其它 β -Gal 的系统聚类分析

节点上的数值表示 Bootstrap 重复 1 000 次的置信度

Fig. 2 Phylogenetic tree of the alignment of *FaTβgal* deduced amino acid sequences with other β -Gal genes

Values at nodes show the confidence level of Bootstrap replication 1 000

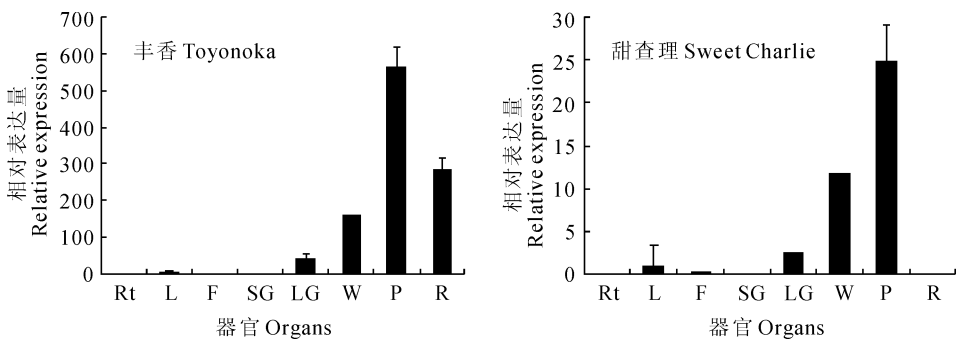


图 3 草莓果实发育成熟过程中 β -Gal 基因荧光定量分析

Rt. 根; L. 叶; F. 花; SG. 小绿果; LG. 大绿果; W. 白果; P. 粉红果; R. 全红果

Fig. 3 Expression analysis of β -Gal genes during development and ripening of strawberry fruits by qRT-PCR

Rt. Root; L. Leaf; F. Flower; SG. Small green fruit stage; LG. Large green fruit stage;

W. White fruit stage; P. Pink fruit stage; R. Red fruit stage

Gal 基因 *pBG(a)*、*pBG(b)*、*pPBG1*, 鳄梨 (*Persea americana*) 4 个 β -*Gal* 基因 *AV-GAL*、*PaGAL2*~4 等, 5 个物种 24 个 β -*Gal* 基因与 *FaT β gal* 推导的氨基酸序列进行系统聚类分析, 结果表明, *FaT β gal* 聚在一个独立的分枝上(图 2), 这暗示 *FaT β gal* 可能具有独特的作用。

2.3 β -*Gal* 基因表达

2 个草莓品种果实发育成熟过程中 β -*Gal* 基因表达变化趋势如图 3 所示。 β -*Gal* 基因伴随着果实成熟其表达量快速上升, 果实粉红期达到峰值, ‘甜查理’果实在全红阶段表达量迅速下降至检测不到, 而‘丰香’果实仍保持较高的表达量。与营养器官根叶相比, ‘丰香’果实在整个成熟阶段 β -*Gal* 基因相对表达量高于‘甜查理’果实。

3 讨 论

β -*Gal* 是属于糖苷水解酶超级家族的一个多基因家族。目前, 仅 Trainotti 等^[18]从草莓果实中分离了 3 个 β -*Gal* 基因, 分别为 *Fa β gal1* (AJ278703)、*Fa β gal2* (AJ278704)、*Fa β gal3* (AJ278705)。本研究利用草莓大绿果期和转色期果实构建的 SSH-cDNA 文库, 克隆获得了 *FaT β gal* 基因。*FaT β gal* 与 *Fa β gal1*、*Fa β gal2*、*Fa β gal3* 核苷酸序列相似性很低, *FaT β gal* 推导的氨基酸序列与 *Fa β gal1*、*Fa β gal2*、*Fa β gal3* 相似性仅为 47% 左右。进一步分析, *FaT β gal* 属于糖基水解酶 35 家族的成员, 包含保守序列 GGPIILSQIENEY, 该位点为 β -*Gal* 酶的活性催化位点。*FaT β gal* 还包含一个半乳糖结合的凝集素结构域, 可能具有特异性结合半乳糖残基的作用。*Fa β gal1*、*Fa β gal2* 和 *Fa β gal3* 具有糖基水解酶活性位点的保守结构域, 而仅有 *Fa β gal1* 和 *Fa β gal2* 多肽链 C 末端有一个凝集素结构域^[18]。这些结构特征表明 *FaT β gal* 为草莓 β -*Gal* 基因家族的一个新成员。

β -*Gal* 基因家族内的各个基因功能各异。Smith 和 Gross^[9]从番茄果实中克隆了编码 β -*Gal*

II 的 7 个 β -*Gal* (*TBG*) 基因, 通过反义抑制研究其在果实发育成熟过程中的功能, 结果表明, *TBG1* 对总 β -*Gal* 酶活水平没有影响, *TBG3* 也未能明显延缓果实成熟软化^[23]; 在 *Nr*、*rin* 和 *nor* 番茄突变体果实中 *TBG1* 和 *TBG3* 表达模式与野生型果实相同^[9]; 但 *TBG4* 在 *rin* 和 *nor* 番茄突变体中的表达量显著低于野生型果实, 抑制 *TBG4* 的表达能明显延长果实软化^[24]; *TBG6* 仅在绿果期表达, 在果实成熟软化过程中没有或作用较小^[25]。在砂梨中至少有 7 个 β -*Gal* 基因 *PpGAL1*~*PpGAL7*, *PpGAL1* 和 *PpGAL4* 在果实发育过程中不表达, 但在果实成熟时表达量上升; 而另外 5 个 *PpGAL* 基因却随着果实发育成熟其表达量逐渐下降。外源乙烯能够抑制 *PpGAL6* 和 *PpGAL7* 的表达, 诱导 *PpGAL1* 和 *PpGAL4* 表达, 而对 *PpGAL2*、*PpGAL3* 和 *PpGAL5* 的表达没有影响^[10]。在鳄梨果实成熟过程中, 4 个 β -*Gal* 基因的表达模式也有差异, *AV-GAL1* 和 *PaGAL2* 在果实成熟过程中表达, *PaGAL2* 表达水平较高且稳定; *PaGAL3* 和 *PaGAL4* 在果实中不表达。外源乙烯能够诱导 *PaGAL1* 表达, 抑制 *PaGAL3* 表达^[26]。草莓果实中 3 个 β -*Gal* 基因的表达特性不同, *Fa β gal1* 的表达量在果实成熟阶段显著增加, 至果实全红阶段达到峰值, 而 *Fa β gal2*、*Fa β gal3* 在绿果期表达量较高, 随着果实发育和成熟表达量却显著降低至几乎检测不到, 由此确定仅 *Fa β gal1* 参与果实成熟软化进程。本研究分离的 *FaT β gal* 基因, 虽然与 *Fa β gal1* 氨基酸序列相似性较低, 但表达模式趋于相同, 在果实成熟过程中表达量快速上升, 推定 *FaT β gal* 与果实成熟相关。比较软质品种‘丰香’与硬质品种‘甜查理’2 个品种 β -*Gal* 的表达模式发现, 随着果实的成熟, 二者表达量均快速增加, 果实完全成熟后迅速下降, ‘甜查理’ β -*Gal* 表达量迅速降低至很低的水平, 而‘丰香’ β -*Gal* 表达量却仍保持在较高水平。二者在果实软化阶段表达量的差异表明, *FaT β gal* 基因可能与二者果实软化速率相关。

参考文献:

- [1] PRASANNA V, PRABHA T N, THARANATHAN R N. Fruit ripening phenomena-An overview[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, 47(1): 1-19.
- [2] SMITH D L, STARRETT D A, GROSS K C. A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening: Cloning, characterization and expression pattern[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(2): 417-423.
- [3] TIAN A M (田爱梅), LIU J L (刘金龙), CAO J SH (曹家树). Beta galactosidase in plants[J]. *Chinese Journal of Cell Biology* (中国细胞生物学学报), 2014, 36(5): 703-707 (in Chinese).

- [4] LAZAN H, NG S Y, GOH L Y, *et al.* Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, **42**(11): 847—853.
- [5] CARRINGTON C M S, PRESSEY R. β -galactosidase II activity in relation to changes in cell wall galactosyl composition during tomato ripening[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1996, **121**(1): 132—136.
- [6] LAZAN H, SELAMAT M K, ALI Z M. β -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening[J]. *Physiologia Plantarum*, 1995, **95**(1): 106—112.
- [7] ALI Z, NG S Y, OTHMAN R, GOH L Y, *et al.* Biochemistry and metabolism isolation, characterization and significance of papaya β -galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening[J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, **104**(1): 105—115.
- [8] RAZZLI M, ALI Z, LAZAN H, *et al.* Quality related changes and softening enzymes activities during ripening of Sekaki papaya[J]. *Acta Horticulturae*, 2007, 740: 333—335.
- [9] SMITH D L, GROSS K C. A family of at least seven galactosidase genes is expressed during tomato fruit development[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123: 1 173—1 184.
- [10] MWANIKI M W, MATHOOKO F M, MATSUZAKI M, *et al.* Expression characteristics of seven members of the β -galactosidase gene family in ‘La France’ pear (*Pyrus communis* L.) fruit during growth and their regulation by 1-methylcyclopropene during postharvest ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, **36**(3): 253—263.
- [11] OTHMAN R, CHONG H L, CHOO T S, *et al.* Three β -galactosidase cDNA clones related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya*) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, **33**(6): 2 301—2 310.
- [12] ZHUANG J P, SU J, LI X P, *et al.* Cloning and expression analysis of β -galactosidase gene related to softening of banana (*Musa* sp.) fruit [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, **32**(4): 411—419.
- [13] LÜ Y R(吕燕荣), REN X L(任小林), ZHOU H L(周会玲). Cloning and expressing analysis of β -galactosidase gene in jujube fruit[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(7): 1 318—1 325(in Chinese).
- [14] GAO SH(高山), CHEN G X(陈桂信), XU D X(许端祥), *et al.* Cloning, expression, and subcellular localization of β -galactosidase gene from *Momordica charantia* L. fruit[J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2013, **14**(6): 1 124—1 129(in Chinese).
- [15] KNEE M, SARGENT J A, OSBORNE D J. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1977, **28**(2): 377—396.
- [16] REDGWELL R J, MACRAE E, HALLETT I, *et al.* *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening[J]. *Planta*, 1997, 203: 162—173.
- [17] XUE B Y(薛炳烨), MAO ZH Q(毛志泉), SHU H R(束怀瑞). Changes in glycosidases and cellulase activities, and cell wall composition in strawberry fruits during development and ripening[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), 2006, **32**(3): 363—368(in Chinese).
- [18] TRAINOTTI L, SPINELLO R, PIOVAN A, *et al.* β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**(361): 1 635—1 645.
- [19] QIAN CH(钱 春), ZHANG X G(张兴国), LIANG G L(梁国鲁). Progress in studying genes related to strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruit ripening and softening[J]. *China Vegetables* (中国蔬菜), 2009, 22: 6—12(in Chinese).
- [20] TONG ZH G(佟兆国), WANG F(王 飞), GAO ZH H(高志红), *et al.* Advances in research on the relationship between pectolytic enzymes and fruit softening[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2011, **28**(2): 305—312(in Chinese).
- [21] ZHANG Y T(张云婷), TANG H R(汤浩茹), CHEN Q(陈 清). Research progress in the mechanism of ripening and softening of strawberry[J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学报), 2015, **51**(6): 813—820(in Chinese).
- [22] ZHOU H CH(周厚成), LI G(李 刚), ZHAO X(赵 霞), *et al.* Construction of suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library from two developmental stages of *Fragaria* $\times$ *ananassa* fruit and expression analysis of related genes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2013, **21**(6): 641—649(in Chinese).
- [23] CAREY A T, SMOTH D L, HARRISON E, *et al.* Down-regulation of a ripening-related β -galactosidase gene (*TBG1*) in transgenic tomato fruits[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**(357): 663—669.
- [24] SMITH D L, ABBOTT J A, GROSS K C. Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening[J]. *Plant Physiology*, 2002, **129**(4): 1 755—1 762.
- [25] MOCTERUMA E, SMOTH D L, GROSS K C. Antisense suppression of a β -galactosidase gene (*TBG6*) in tomato increases fruit cracking [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, **54**(390): 2 025—2 033.
- [26] TATEISHI A, SHIBA H, OGIHARA J, *et al.* Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, **45**(1): 56—65.