

## 葡萄成熟过程中生理特征与 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的表达分析

段朝瑞<sup>1</sup> 陈佩<sup>1</sup> 张国军<sup>2</sup> 丁颖<sup>1</sup> 汪文乐<sup>1</sup> 高媛圆<sup>1</sup> 王乐怡<sup>1</sup> 赵飞<sup>1</sup> 冷平<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

**摘要** 为了解  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因是否与葡萄果实成熟有关, 从基因库中分离出了 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 分别命名为 *VvBG1*, *VvBG2* 和 *VvBG3*, 并对其表达进行了分析。结果显示: 所获得的 3 个基因在葡萄浆果成熟过程中均有表达。果皮中, 随着果实的成熟, *VvBG1* 变化较平稳; *VvBG2* 在转色期时略有降低, 之后不断升高, 在完熟期时达到最大值; *VvBG3* 在成熟过程中先升高后降低, 在转色期时达到高峰。果肉中, *VvBG1* 和 *VvBG2* 分别与果皮 *VvBG2* 和 *VvBG3* 变化趋势相似; *VvBG3* 在转色前期和成熟期时表达较低, 在完熟期达到最大值。种子中, *VvBG1* 在转色前期出现最大值, 之后迅速降低; 随着果实的成熟, *VvBG2* 不断上升; *VvBG3* 在转色期时有个小峰, 之后不断降低, 在完熟期时表达量最低。综上, 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在葡萄成熟过程中的表达量和表达模式均不相同。其中果皮 *VvBG3* 和果肉 *VvBG2* 的变化趋势与 ABA 一致, 可能在果实成熟过程中对 ABA 水平调节起作用。

**关键词** 葡萄; 脱落酸水平;  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因

中图分类号 S 663.1

文章编号 1007-4333(2013)02-0050-06

文献标志码 A

## Expression of beta-glucosidase genes *VvBGs* and physiological feature in the berry of Muscat Hamburg during grape maturation

DUAN Chao-ru<sup>1</sup>, CHEN Pei<sup>1</sup>, ZHANG Guo-jun<sup>2</sup>, DING Ying<sup>1</sup>, WANG Wen-le<sup>1</sup>,  
GAO Yuan-yuan<sup>1</sup>, WANG Le-yi<sup>1</sup>, ZHAO Fei<sup>1</sup>, LENG Ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Research Institute of Pomology, Forestry Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract** In order to investigate the relationship between beta-glucosidase genes and grape berry maturation, we identified three beta-glucosidase genes from NCBI named as *VvBG1*, *VvBG2* and *VvBG3* and then analyzed their expression. The results showed that three genes were all expressed during grape berry ripening. In peel, the expression of *VvBG1* changed smoothly along with berry ripening, while the expression of *VvBG2* was slightly low at véraison, then increased gradually and reached the maximum at full ripening stage. However, the expression of *VvBG3* increased at first, then decreased and had a transient expression peak at véraison. In pulp, expression patterns of *VvBG1* and *VvBG2* displayed similar trends with *VvBG2* and *VvBG3* in peel. The *VvBG3* expressed relatively low at véraison, with the expression peak at full ripening stage. In seed, the expression of *VvBG1* was highest at pre-véraison, then decreased rapidly. The expression of *VvBG2* rose continuously during grape maturation, while the *VvBG3* gene had a small expression peak at véraison, then reduced to the lowest at the stage of full ripening. In summary, the expression patterns and levels of the three beta-glucosidase genes performed differently during grape maturation. Among them, the trends of *VvBG3* in peel and *VvBG2* in pulp were in consistent with the change of ABA, which might indicate that the two genes played a role in regulating ABA content during grape berry ripening.

**Key words** Grape; regulation of ABA content; beta-glucosidase genes

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 北京市科委重大资助项目(D0706002000091); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目

第一作者: 段朝瑞, 硕士研究生, E-mail: dchaorui@126.com

通讯作者: 冷平, 教授, 主要从事果品采后生理与分子生物学研究, E-mail: pleng@cau.edu.cn

根据果实在成熟过程中是否有呼吸峰的出现,将果实分为呼吸跃变型和非呼吸跃变型2种类型。迄今,对于跃变型果实成熟的调节与信号转导途径方面的研究已经取得很大进展,尤其是在番茄上,通过大量的成熟缺陷突变体的研究获得了大量信息。对这些成熟缺陷突变体的研究在基因水平上证明了乙烯是跃变型果实成熟的最基本的信号物质。与这类跃变型果实相比,对非跃变型果实成熟的分子调控机制更是缺乏了解。葡萄作为非跃变型果实,一般认为它的成熟是由ABA调控的,而乙烯只起很小的作用<sup>[1]</sup>。植物体内ABA水平受到其合成与代谢两个途径的调控。而ABA的失活代谢包括氧化降解和糖基链接两个主要途径。在氧化降解过程中,ABA经8'-羟化作用生成羟甲基戊二酰(HMG)-HOABA和甲酯(Me)HMG-HOABA,红花菜豆酸(Phaseacid, PA),二氢红花菜豆酸(Dehydrop haseic acid, DPA)等。糖基链接是指游离的ABA也能通过糖基链接与糖结合成ABA-GE(脱落酸葡萄糖酯)和ABA-GS(脱落酸葡萄糖苷)。还有葡萄糖基转移酶GTase在植物次生代谢过程中起着重要作用。该酶能将核苷二磷酸中葡萄糖基转移给低分子受体。在GTase催化下,ABA和UDP-D-Glc(UDPG)反应生成ABA-GE。ABA-GE是ABA的代谢产物之一<sup>[2]</sup>,在调控ABA水平上起重要作用。此外,已有报道在拟南芥中克隆出拟南芥 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(*AtBGL*)可以催化ABA-GE水解释放出活性ABA使植物体内ABA水平上升<sup>[3]</sup>,这又一次证明ABA-GE对于植物细胞内ABA的动态平衡具有很重要的作用<sup>[4-6]</sup>。Sun等<sup>[7]</sup>研究发现,*CmBGL*在甜瓜发育过程中,与ABA积累密切相关,且对ABA合成起到重要的调节作用;Li等<sup>[8]</sup>研究表明,*CIBGL*在西瓜果实发育早期表达水平相对较低,随着果实成熟,表达量在成熟期到达高峰。

葡萄作为非跃变型果实虽然缺少乙烯,也没有呼吸跃变。然而它却表现出同番茄等跃变型果实相同的成熟现象,即伴随着浆果成熟,其细胞壁代谢、色素合成和糖代谢相关基因表达逐渐增强,相关酶活性持续上升。说明葡萄浆果与番茄等跃变型果实可能有共同的成熟调控机制。而ABA很有可能就是上述2种类型果实共同的成熟调控因子,因为ABA从果实成熟开始后迅速增加<sup>[9-10]</sup>并与糖的积累,酸的降低<sup>[11-12]</sup>,以及果实的着色<sup>[13-15]</sup>均有很高的相关性。最近发现,ABA通过调节ACC(1-

aminocyclopropane-1-carboxylic acid)合成酶ACS和ACC氧化酶(ACO)基因的表达来刺激系统2乙烯的自动催化,从而启动了番茄果实成熟过程,而乙烯在果实成熟的后期,尤其是在果实固有风味的形成过程中起重要作用<sup>[16]</sup>。这个结果暗示ABA与乙烯之间存在着功能性交感与相互作用。然而, $\beta$ -葡萄糖苷酶在葡萄浆果成熟过程中起什么作用还不十分清楚。

本研究通过对NCBI基因库中分离出的3个 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在葡萄成熟过程中的表达进行分析,为进一步鉴定葡萄糖苷酶基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试品种为种植于中国农业大学科技园区葡萄园中的12年生葡萄玫瑰香(*Vitis vinifera* L. cv. *Muscat Hamburg*)供试。盛花期在2011年5月中旬,取样时间分别为7月6日(转色前),7月9日(转色期),7月13日(红果期),7月18日(成熟期),7月25日(完熟期),共5次取样。从试验地采回鲜样后,用手术刀迅速将果皮,果肉,种子分开,立即用液氮冷冻,做好标记放于-80℃保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 可溶性糖和可滴定酸的测定

可溶性总糖: 蒽酮指示剂法<sup>[17]</sup>。称取果肉1g,研磨成匀浆,加入15mL蒸馏水洗涤干净,转入试管中,用塑料薄膜封口,沸水中提取30min。取出待冷却后过滤到100mL容量瓶中,将残渣回收到试管中,加入15mL蒸馏水煮沸10min,过滤到容量瓶中。用蒸馏水反复洗涤试管和残渣,过滤后一并转入容量瓶并定容。取2mL样品提取液,加入0.5mL蒽酮-乙酸乙酯试剂和5mL浓硫酸,充分振荡,立即将试管放入沸水中保温1min,取出冷却至室温,在波长630nm处用分光光度计(SP-1900UV)测定光密度OD值。3个重复。按照制作的标准曲线( $y=0.0074x+0.0899, R^2=0.9971$ ),( $x$ 为蔗糖质量, $y$ 为OD值)计算,可溶性总糖/%= $[(M_1 \times V \times N)/(V_s \times M_2 \times 10^6)]$ ( $M_1$ ,从标准曲线查得的蔗糖质量, $\mu\text{g}$ ;  $V$ ,样品提取液的总体积,mL;  $N$ ,溶液稀释倍数;  $V_s$ ,测定时所取样品提取液的总体积,mL;  $M_2$ ,样品质量,g)。

可滴定总酸: 采用酸碱滴定法<sup>[18]</sup>。称取果肉1g,加入蒸馏水研磨成匀浆,放在离心管中30min,

在 5 000 r/min 离心 20 min, 将上清液转入 100 mL 容量瓶定容, 取 50 mL, 滴 2 滴 1% 酚酞, 用 0.01 mol/L 标准 NaOH 滴定。可滴定总酸含量/% =  $[(C \times V \times V_0) / (V_s \times M)]$  ( $V$ , 样品提取液的总体积, mL;  $V_s$ , 滴定时所取样品体积, mL;  $M$ , 样品质量, g;  $V_0$ , 滴定消耗的 NaOH 体积, mL;  $C$ , NaOH 摩尔浓度, mol/L)。3 个重复。

### 1.2.2 ABA 提取与测定

ABA 提取: 在陈昆松<sup>[19]</sup>的方法上进行改进, 提取分离 ABA。准确称取 2.00 g 样品, 用液氮研磨成粉末, 分别加入 40 mL 80% 甲醇和 4 mg 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚抗氧化剂, 超声波处理 20 min, -20 °C 黑暗条件下浸提 18 h 后, 4 °C, 10 000g 离心 30 min, 取上清, 沉淀中再加入 40 mL 80% 甲醇, 摇匀, 超声波处理 20 min, -20 °C 黑暗条件下浸提 2 h 后, 4 °C, 10 000g 离心 30 min, 合并上清, 沉淀中再加入 20 mL 80% 甲醇, 摇匀, 超声波处理 20 min, -20 °C 黑暗条件下浸提 2 h 后, 4 °C, 10 000g 离心 30 min, 合并上清。于 44 °C 条件下旋转蒸发 ( $V$  小于 20 mL), 之后用 10 mL 石油醚洗涤残渣, 而后用 pH 8.0 磷酸缓冲液溶解残渣。调 pH 8.0, 之后用等体积石油醚脱色 3 次, 剩余水相调 pH 8.0 后, 加入 0.2 g 水不溶性 PVPP, 低温搅拌 15 min 后真空抽滤, 将磷酸缓冲液调 pH 3.0 后, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 44 °C 条件下旋转蒸干, 加入 1.5 mL 50% 色谱级甲醇洗涤残渣, 用高效液相色谱测定 (Agilent technologies, 1200 Series, USA)。

ABA 测定: 使用液相色谱 (Agilent technologies, 1200 Series, USA) 测定, 甲醇为 Fisher chemical 公司色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 试验用水为超纯水。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS C18 柱 (4.8 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇和体积分数为 0.8% 的冰醋酸, 梯度洗脱条件 0~4 min 45% 的冰醋酸, 4~5 min 50% 的冰醋酸, 5~17 min 60% 的冰醋酸, 17~18 min 60% 的冰醋酸, 18~19 min 45% 的冰醋酸; 柱温 27 °C; 检测波长: 254 nm, 进样量: 20  $\mu$ L, 流速 1 mL/min。定量方法采用外标法 (峰面积), 试验重复 3 次。

ABA 标准曲线: 准确称取 10 mg ABA 标准样品 (( $\pm$ )-Abscisic acid, sigma, A1049), 50% 色谱级甲醇溶解, 1 000 mL 容量瓶定容, 配制浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 ABA 标准液。梯度稀释, 得到质量浓度分别为 1、0.1、0.01 和 0.001  $\mu$ g/mL (ABA) 标准

液, 液相色谱测定其峰面积, 制作峰面积与浓度关系的标准曲线。

### 1.2.3 RNA 提取, RT-PCR 及实时荧光定量 PCR 分析

果实 RNA 提取用热硼酸法<sup>[20]</sup>。分别从不同时期葡萄果皮、果肉和种子中提取总 RNA。并使用反转录酶 (Takara, Dalian, China) 和 Oligo dT 引物反转录得到 cDNA, 存放于 -20 °C 用于后续试验。

在 NCBI 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU480917.1>; [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\\_003632325.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003632325.1); [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\\_002272377.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_002272377.1)) 分离出 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 在本试验中分别命名为  $VvBG1$ ,  $VvBG2$ ,  $VvBG3$ , GenBank 序列号分别为 GU480917, XM\_003632325, XM\_002272377。根据其特异性序列区域, 采用 Primer 5 设计引物 (引物  $VvBG1$  上游 5'-TGAACCTT-ACATAGTTGCCACCAT-3', 下游 5'-AATCC-CCATACATCAGAGGGTCAAT-3';  $VvBG2$  上游 5'-ATAGTGAAGAAGAGGGCAGGCACG-3', 下游 5'-GCGGCCATATCTGCAAGAAAGTC-3';  $VvBG3$  上游 5'-GCCGCAGAATAGTAGAAGACTTTGC-3', 下游 5'-GCAATATAAGGCTCGGTTGATGAGT-3'), 在一定 PCR 条件下进行特异性扩增。PCR 条件为 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s 及 72 °C 15 s (35 个循环), 随后是 72 °C 10 min, 最后 4 °C 保温。

使用 Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research, Australia) 进行扩增及分析, 选用 SAND 作内参 (引物上游 5'-GCGACGAGTGAGTCT-GGGATTG-3', 下游 5'-GCGACGAGTGAGT-CTGGGATTG-3'), 使用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> kit (TaKaRa, Dalian, China)。实时定量 PCR 反应体系包括: 0.4  $\mu$ L 上下游特异性引物, 1.5  $\mu$ L cDNA, 10  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 ×) mix 和 7.7  $\mu$ L 水。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 72 °C 15 s (40 个循环)。基因的绝对表达量用 Roter-Gene 6.1.81 软件进行计算。生物学重复 3 次。最后用 Origin 软件进行计算和作图分析。

## 2 结 果

### 2.1 葡萄果实发育与成熟过程中可溶性糖和可滴定酸含量的变化

玫瑰香葡萄浆果整个发育过程自盛花期后历时

12 周,其发育动态可以划分为 3 个阶段:1~4 周为浆果的快速生长期,5~8 周为缓慢生长期,9~11 周为第 2 次迅速生长期<sup>[21]</sup>。在浆果成熟开始前后,形态学上的变化主要表现在浆果颜色的变化上,果实从深绿色变成浅绿色(即褪绿),进一步变成红绿色(即转色期)。由图 1 可以看出,葡萄浆果含糖量从 7 月 9 日开始急剧上升,含酸量则开始急剧下降,这些生理指标变化意味着葡萄浆果成熟的开始(véraison)。以后浆果不断褪绿着色,至 7 月 18 日果面全部变红,为商业采收期,7 月 25 日浆果完全成熟,此时,浆果含糖量不再大幅增加,果皮颜色变深。本研究观察到的结果与许雪峰等<sup>[21]</sup>对玫瑰香葡萄的调查结果基本一致。

葡萄果皮、果肉和种子中 ABA 含量变化趋势基本一致(图 2)。转色前(7 月 6 日)含量较低,之后快速上升,在转色期时(7 月 9 日)时达到最大值,之

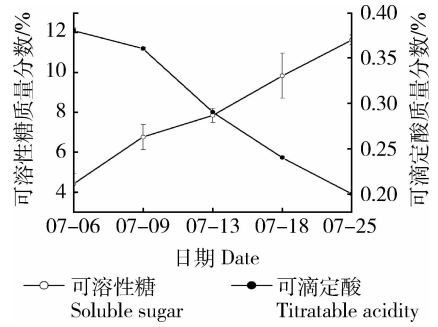


图 1 玫瑰香葡萄成熟过程中,可溶性糖和可滴定酸质量分数的变化

Fig. 1 Changes of soluble sugar content and titratable acidity in berries of Muscat Hamburg during grape maturation

后随着葡萄果实的不断成熟,ABA 含量逐渐降低。此外,我们注意到,果皮、果肉和种子中 ABA 的峰值均是在转色期时检测到。

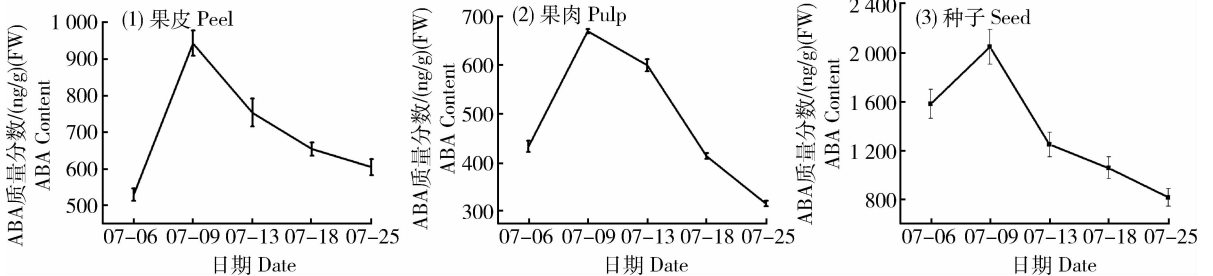


图 2 玫瑰香葡萄成熟过程中,果皮、果肉和种子中 ABA 含量变化

Fig. 2 Changes of ABA content in peel, pulp and seed of Muscat Hamburg during grape maturation

## 2.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的结构特征

从 NCBI 中选择了 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因,其中 *VvBG1* 全长为 1 518 bp, *VvBG2* 和 *VvBG3* 分别为 1 539 和 1 844 bp,开放阅读框分别编码 505、512 和 518 个氨基酸。同源性分析表明,核苷酸碱基序列与拟南芥中  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(NM\_102418.3、NM\_179247.5 和(NM\_112690.3)相似性高达 93%、88%和 77%。通过制作 BG 基因家族进化树,发现 *VvBG1* 与橡胶树  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(EF100816.1)处于同一分支上, *VvBG2* 与拟南芥  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(NM\_102418.3)关系密切,而 *VvBG3* 与拟南  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(NM\_001125052.1)和樱桃  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(U39228.1)联系紧密。此外,将葡萄  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的氨基酸序列与玉米(AAD10503.1),大麦(ACF07998.1),紫花苜蓿(ABW76288.1),百脉根(ACD65510.1)进行比对,发现起酸/碱作用的谷氨酸残基(E)位于

TXNEX 序列中(X 代表疏水氨基酸残基),起亲核试剂作用的谷氨酸残基位于 I/VTENG 序列中<sup>[22-24]</sup>。

## 2.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(*VvBG1*, *VvBG2*, *VvBG3*) 在葡萄果实成熟过程中的表达

实时荧光定量 PCR 对 *VvBG1*, *VvBG2*, *VvBG3* 基因表达分析显示,果皮中(图 3), *VvBG1* 在转色前到浆果完熟的整个过程中,变化较平稳; *VvBG2* 在转色期时略有降低,之后不断升高,在完熟期时取得最大值; *VvBG3* 先升高后降低,在转色期时达到高峰。果肉中(图 4), *VvBG1* 与果皮 *VvBG2* 变化趋势相似,在转色期时其表达量略有降低,之后不断上升,在完熟期出现峰值;随着浆果不断成熟, *VvBG2* 则是先升高后降低,在转色期时有最大值; *VvBG3* 在转色前和成熟期时表达较低,在完熟期出现最大值。种子中(图 5), *VvBG1* 在转色前出现最大值,之后迅速降低,在转色期和成熟期时表达水平均较低; *VvBG2* 在整个成熟过程中呈上升的趋势;

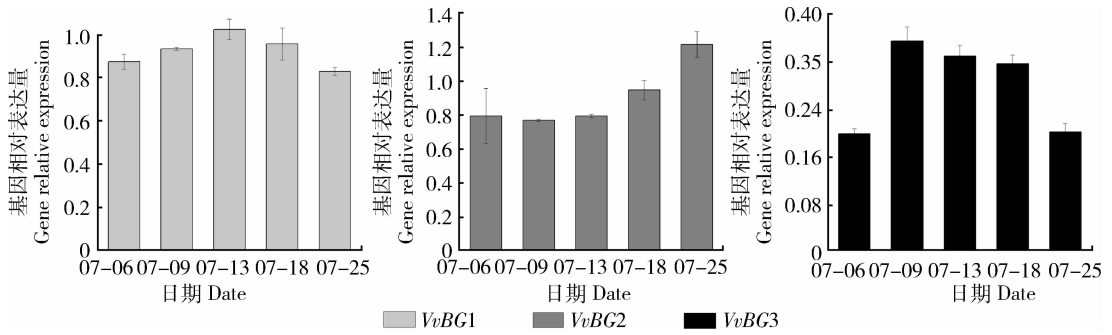


图3 玫瑰香葡萄成熟过程中, *VvBG1*、*VvBG2* 和 *VvBG3* 在果皮中的表达

Fig. 3 Expression of *VvBG1*, *VvBG2* and *VvBG3* in the peel of Muscat Hamburg during grape maturation

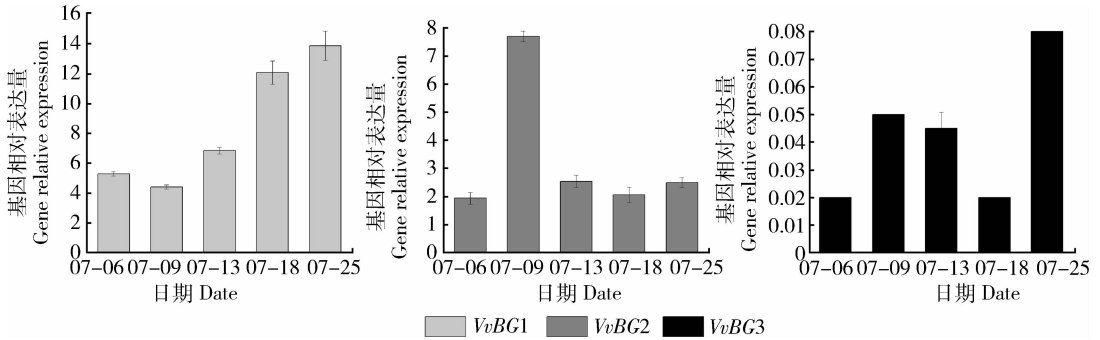


图4 玫瑰香葡萄成熟过程中, *VvBG1*、*VvBG2* 和 *VvBG3* 在果肉中的表达

Fig. 4 Expression of *VvBG1*, *VvBG2* and *VvBG3* in the pulp of Muscat Hamburg during grape maturation

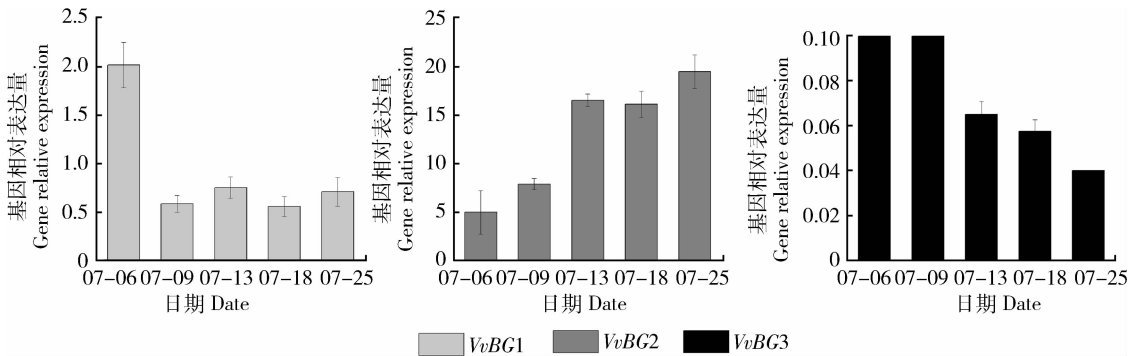


图5 玫瑰香葡萄成熟过程中, *VvBG1*、*VvBG2* 和 *VvBG3* 在种子中的表达

Fig. 5 Expression of *VvBG1*, *VvBG2* and *VvBG3* in the pulp of Muscat Hamburg during grape maturation

*VvBG3* 在转色期时有个小峰, 之后不断降低, 在完熟期时表达量最低。

### 3 讨论

本研究所用试验材料葡萄是非呼吸跃变型果实<sup>[25]</sup>, 产生极低水平的乙烯, 所以乙烯在果实成熟过程中的作用很有限, 而葡萄内源 ABA 水平在果实发育和成熟过程中的明显变化(图 2) 则说明 ABA 在葡萄浆果发育和成熟过程中发挥着十分重要的作用。随着果实的成熟, 可滴定酸不断下降, 而可溶性糖含量不断升高, 并伴随着果皮颜色的逐渐

变红和 ABA 含量的不断变化。由此可看出 ABA 与葡萄浆果成熟有很大的相关性, 可能作为果实成熟的初始诱导剂促进了果实一系列生理生化反应而最终诱导果实成熟。

糖基链接途径是 ABA 失活的主要途径之一, 在相关酶作用下 ABA 与葡萄糖等物质结合形成无活性复合物。这一过程是可逆的,  $\beta$ -葡萄糖苷酶可以催化水解此复合物重新释放出活性 ABA, 因此  $\beta$ -葡萄糖苷酶对 ABA 水平的调控发挥着重要作用。本试验中得到的 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在葡萄成熟过程中的表达量和表达模式均不相同。果皮

*VvBG2* 与果肉 *VvBG1* 均是在转色期时表达降低, 与 ABA 的变化趋势相反, 这表明 ABA 可能同时受到其他基因的共同调控; 果皮 *VvBG3* 和果肉 *VvBG2* 的变化趋势与 ABA 一致, 说明它们与 ABA 关系密切, 且两者均在转色期时出现峰值, 可能是 *VvBG2* 通过水解 ABA-GE 等 ABA 复合物来得到游离的 ABA, 从而使 ABA 水平升高。种子中, *VvBG1* 和 *VvBG3* 在成熟期表达较低, 这表明 *VvBG1* 和 *VvBG3* 与果实成熟关系不显著。

本研究表明: 3 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在葡萄成熟过程中的表达量和表达模式均不相同。其中果皮 *VvBG3* 和果肉 *VvBG2* 的变化趋势与 ABA 一致, 可能在果实成熟过程中对 ABA 水平调节起作用。

### 参 考 文 献

- [1] Kanellis A K, Diallinas G, Kalaitzis P, et al. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase in response to ripening and wounding in muskmelon fruit [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(1): 179-179
- [2] Zheng-Jun Xu, Masatoshi Nakajima, Isomaro Yamaguchi, et al. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(3): 1285-1295
- [3] Lee K H, Piao H L, Kim H Y, et al. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid[J]. *Cell*, 2006, 126: 1109-20
- [4] Hartung W, Sauter A, Hose E. Abscisic acid in the xylem: Where does it come from and where does it go? [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(366): 27-32
- [5] Sauter A, Hartung W. The contribution of internode and mesocotyl tissues to root-to-shoot signalling of abscisic acid [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(367): 297-302
- [6] Sheila D S, Chiwocha Adrian, Cutler J, et al. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42: 35-48
- [7] Yufei Sun, Pei Chen, Chaorui Duan, et al. Transcriptional regulation of genes encoding key enzymes of abscisic acid metabolism during melon (*Cucumis melo* L.) fruit development and ripening [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, DOI 10.1007/s00344-012-9293-5
- [8] Li Q, Li P, Sun L, et al. Expression analysis of  $\beta$ -glucosidase genes that regulate abscisic acid homeostasis during watermelon (*Citrullus lanatus*) development and under stress conditions[J]. *Journal Plant Physiology*, 2012, 169(1): 78-85
- [9] Vendrell M, Buesa C. Relationship between abscisic acid content and ripening of apples [J]. *Acta Horticulturae (Wageningen)*, 1989, 258: 389-396
- [10] Buesa C, Dominguez M, Vendrell M. Abscisic acid effects on ethylene production and respiration rate in detached apple fruits at different stages of development [J]. *Rev Espan Cien Tecnol Aliment*, 1994, 34(5): 495-506
- [11] Manning K. Changes in gene-expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin [J]. *Planta*, 1994, 194(1): 62-68
- [12] Jiang Y, Joyce D C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 39: 171-174
- [13] Richardson G R, Cowan A K. Abscisic-acid content of citrus flavedo in relation to color development [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1995, 70(5): 769-773
- [14] Masaya Kato, Hikaru Matsumoto, Yoshinori Ikoma. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(10): 2153-2164
- [15] Rodrigo M J, Berta Alquezar, Lorenzo Zacarias, et al. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(3): 633-643
- [16] Zhang M, Yuan B, Leng P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60: 1579-1588
- [17] Laurentin A, Edwards C A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 315: 143-145
- [18] 龙淑珍, 何永群. 荔枝可滴定酸与维生素 C 的测定及其相关性 [J]. *广西农业科学*, 2002(4): 188-189
- [19] 陈昆松, 徐昌杰, 李方, 等. HPLC 法检测果实组织中内源 IAA, ABA 方法的改进 [J]. *果树学报*, 2003, 20(1): 4-7
- [20] Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Ann Biochem*, 1994, 223: 7-12
- [21] 许雪峰, 罗国光, 彭宜本. 玫瑰香葡萄浆果生长发育动态及其变化特点 [J]. *园艺学报*, 1995, 22(4): 318-322
- [22] Opassiri R, Cairns J R K, Akiyama T, et al. Characterization of a rice  $\beta$ -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot [J]. *Plant Science*, 2003, 165: 627-638
- [23] Wang Q, Trimbur D, Graham R, et al. Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* beta-glucosidase by kinetic-analysis of mutants [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 14554-14562
- [24] Withers S G, Warren R A J, Street I P, et al. Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a retaining glycosidase [J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 5887-5889
- [25] Coombe B G. Research on development and ripening of the grape berry [J]. *Am J Enol Vitlc*, 1992, 43(1): 101-110