丁保朋,李小白,林雨静,等.'玉露香梨'生长素烟酰胺合成酶基因*GH3*克隆及其生物信息特征研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(3):14-23.
Ding B P, Li X B, Lin Y J, et al.Cloning and bioinformatics analysis of the auxin nicotinamide synthase genes GH3 in 'Yuluxiangli'[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(3):14-23.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202403020

'玉露香梨'生长素烟酰胺合成酶基因GH3克隆及其生物信息特征研究

丁保朋[1,2*],李小白[3],林雨静[2],胡朝慧[2],杨茹[2],韦博霖[2],曹一凡[2],白钰琳[2],闫如玉[2],李六林[2*]

(1.山西大同大学 煤基生态碳汇技术教育部工程研究中心,山西 大同 037009;2.山西农业大学 园艺学院,山西 晋中 030801;3.大同市综合检验检测中心,山西 大同 037009)

摘　要:[目的]'玉露香梨'果实萼片宿存严重降低其商品价值,筛选并鉴定其果实萼片发育关键基因,可为从分子水平培育萼片脱落的梨果实提供参考基因。[方法]以棚架栽培的'玉露香梨'为试材,结合前期BSA基因定位测序数据,对候选基因表达特征进行验证、克隆并分析2个生长素酰胺合成酶基因GH3家族生物信息特征。[结果]基因*PbGH3.3*(*Pbr007550*)和*PbGH3.4*(*Pbr030571*)在萼片的表达量排名第二;*PbGH3.3*和*PbGH3.4* CDS长度均为1806 bp,编码601个氨基酸,其中二者存在7个氨基酸序列的差异,编码的蛋白PbGH3.3和PbGH3.4序列与苹果MdGH3.1的同源性最高;属于不稳定性蛋白,无信号肽的存在,定位于细胞质;利用NCBI网站CCD工具分析发现均具有GH3蛋白家族的GH3 superfamliy保守结构域,蛋白质三级建模后发现为GH3.1 AUXIN缀合酶,涉及生长素稳态,属于GH3蛋白家族。STRING互作网络蛋白成员GO和KEGG功能富集分析表明*PbGH3.3*参与植物激素尤其是生长素信号通路,推测*PbGH3.3*和*PbGH3.4*可能在'玉露香梨'果实萼片脱落中通过IAA信号通路发挥生物学功能。

关键词:梨;萼片;生长素烟酰胺合成酶;基因克隆;IAA
中图分类号:S722.3;S661.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)03-0014-10

'玉露香梨'传统分类上属白梨系统,是山西农业大学果树研究所培育而成的'库尔勒香梨'型中熟红梨品种,分别继承其母本新疆'库尔勒香梨'、父本'雪花梨'汁多味甜、皮薄肉细及果个大等优点[1-2],同时部分克服了香梨果形不正等缺点,具有抗逆性强、丰产稳产、地域适应性强等优点[3-5]。'玉露香梨'2014年被国家农业部确定为梨果树发展主导品种,并于2019年入选中国农业品牌目录,隰县玉露香梨又被农业部选为2023年农业品牌精品培育名单。

根据梨果实成熟时萼片脱宿状态,可将其分为宿萼果和脱萼果[6]。'玉露香梨'虽优点众多,但果实萼片存在部分宿存现象。萼片位于花器官的最外层,主要包含上下表皮、维管束和叶肉细胞部分,进化上其为叶的变态器官。萼片发育初期可保护内部结构,减少生殖器官受到外界诸如雨水冲刷及机械损伤的影响[7]。然而,'玉露香梨'萼片宿存可致其果形不整齐、表面平整度下降、易生果锈等问题。

植物器官脱落与遗传生理特性、栽培调控技术、环境因子等有关[8-11]。其中,植物激素生长素在器官脱落中发挥重要作用,如Meir等[12]报道,当组织内游离生长素(IAA)含量下降到一定阈值后,离区组织(Abscission zone, AZ)对乙烯(ETH)存

收稿日期:2024-03-07　　**修回日期**:2024-04-28
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32102364)
作者简介:丁保朋(ORCID:0009-0001-2242-4598),博士,讲师,研究方向:功能基因组学, Email:13834188361@139.com;李小白(ORCID:0009-0008-9035-2996),高级工程师,研究方向:植物生理与生化;丁保朋和李小白为同等贡献作者;丁保朋为第一通讯作者
*通信作者:李六林(ORCID:0000-0003-0554-2311),博士,教授,博士生导师,研究方向:梨栽培生理与遗传育种; Email:tgliulin@163.com

在的敏感性增加,进而诱导器官开始脱落。在模式植物番茄脱落的研究中,用IAA处理外植体后,生长素烟酰胺合成酶基因(*Gretchen Hagen 3*, *GH3*)表达上调,且能诱导外植体开始脱落。以上研究均表明基因*GH3*是IAA诱导花脱落延迟的有效负调控因子[13]。本课题组前期利用'玉露香梨'的双亲'库尔勒香梨'与'雪花梨'杂交获得F1萼片脱宿性状分离群体,将构建的萼片脱落与宿存的极端混池群体进行全基因组集群分离测序(Whole genome bulked segregation analysis, DNA-BSA),定位到与其果实萼片脱落宿存关联的基因*GH3*[14],在'库尔勒香梨'数字表达图谱数据中发现*GH3*在脱落萼片内表达上调,进一步表明基因*GH3*可能参与梨果实萼片脱落过程[15]。

基于此,本研究以棚架式栽培的'玉露香梨'为研究材料,基于前期课题组萼片脱落宿存极端混池分析测序技术,成功定位到基因GH3,该基因参与梨果实萼片发育。为进一步研究此基因家族成员功能,对筛选的2个GH3家族成员的表达量进行验证。同时,对候选的2个家族成员基因进行克隆,并分析其生物信息学特征,为从分子水平研究'玉露香梨'萼片脱落提供参考基因。

1　材料与方法

1.1　试验材料

材料来源于山西省晋中市太谷区的山西农业大学果树研究所(N37°21′17",E112°30′12")。'玉露香梨'的栽培模式为双臂平行式。

主要试剂:克隆酶试剂盒Taq DNA、DNA分子Marker-DL2000、反转录酶试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit购于TaKaRa(中国)公司,凝胶回收试剂盒Simgen、荧光定量PCR实验用品与卡那霉素分别选自新景生物试剂开发有限(杭州)公司,山西睿然科技有限公司和北京美亿美生物技术有限公司。qRT-PCR引物合成和DNA序列测序均由生物工程技术有限公司(上海)完成。

载体与菌株:大肠杆菌菌株(*E. coli*)DH5α、载体pMD-19T来自TaKaRa。

1.2　试验方法

试验处理:选取树势相近,树体健壮的'玉露香梨',于4月上旬盛花初期,上午9时,使用浓度为1000 mg·L^{-1}生长延缓剂PP_{333}和蒸馏水,一次性喷施至整朵花全湿、有药液滴落为止,用于诱导'玉露香梨'果实萼片脱落。实验处理2周后选取3个长势一致的'玉露香梨'的枝条,作为3次生物学重复,脱萼与宿存果的果皮、果肉、萼筒离区组织以及脱落幼果前的花瓣、萼片、叶片、叶芽的单个组织分别收集,作为RNA提取材料。

RNA的提取:采用实验室改良成熟的CTAB法分别提取梨不同组织部位样品的总RNA。

cDNA的合成:根据试剂盒说明操作手册,使用TaKaRa公司的PrimeScript™ RT reagent Kit合成cDNA,去除核基因组DNA反应。

qRT-PCR检测方法:基于Primer Premier 5.0软件,参考中国白梨基因组(http://gigadb.org/search/new? keyword=Pyrus+bretschneideri+),设计*GH3*引物,内参基因为*ACTIN*(*KT943411.1*),对'玉露香梨'萼筒的定量用cDNA校准,引物序列见表1。

基于ChamQTMSYBR®qPCR Master Mix的三步法扩增,同时采用Light Cycler 96进行实时荧光定量检测,3次重复,反应结束后分析溶解曲线并评估引物的特异性。反应体系为20.0 μL:包含2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL, Forward Primer(10uM)0.6 μL, Forward Primer(10uM)0.6 μL, cDNA 2.0 μL, Nuclease-free Water 6.8 μL。

表1　基因*GH3*荧光定量引物名称及序列

Table 1　Name and sequence of *GH3* gene fluorescent quantitative primer

基因序列号 Gene ID	正向引物(5'-3') Forward Primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse Primer (5'-3')
Pbr007550.1(*PbGH3.3*)	TCACCGGATTCCACAACTCG	CTCTGCTTCGTCGGTCTTGT
Pbr030571.1(Pb*GH3.4*)	TTGGATTACTACAGCGGCGGATTG	ACTTCAGAAGGCTTGCACATCGG
KT943411.1	CTCCCAGGGCTGTGTTTCCTA	CTCCATGTCATCCCAGTTGCT

生长素酰胺合成酶基因*PbGH3*的克隆:引物见表2,按照试剂盒说明分别进行目的基因扩增、回收纯化片段、载体构建、转化并进行测序验证。

基因*PbGH3.3*与*PbGH3.4*的生物信息学分

表2 扩增基因名称与引物序列

Table 2 Amplified gene name and primer sequence

基因序列号 Gene ID	引物序列(5'－3') Primer Sequence(5'－3')
PbGH3.3	F:ATGGCTGTCGACTCCTCACT
	R:TTACCGCATCTTCCTTTCAGGA
PbGH3.4	F:ATGGCTGTCGACTCCTCACC
	R:TTATCGCATCTTCCTTTCAGGAGT

析:首先,在线分析GH3蛋白序列的理化性质(http://www.expasy.ch/tools/protparam.Htm);其次,预测蛋白GH3结构(http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/);随后,分析GH3蛋白结构域(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi),结合DNAMAN软件,进行多序列比对(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast);之后,利用SOPMA(http://meta-database.org/wiki/SOPMA)和Interactive(http://swissmodel.expasy.org/interactive)预测GH3蛋白质二、三级结构;然后,分别利用TMHMM(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)、SignalP(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)和PSORT Predition(http://psort1.hgc.jp/form.html)进行跨膜结构、信号肽及亚细胞定位预测与分析;最后,基于STRING进行蛋白网络互作分析(https://version-12-0.string-db.org/)

2 结果与分析

2.1 生长素烟酰胺合成酶基因*GH3*在'玉露香梨'中的表达特性分析

'玉露香梨'基因*PbGH3.3*和*PbGH3.4*染色体定位发现均位于Chr5(图1A)。基因表达分析结果发现在叶芽组织中的表达量显著高于其他组织内,在萼片中表达量次之,除'玉露香梨'宿萼果果肉、宿萼果果皮和脱萼萼筒的基因表达量差异不显著外,其余组织表达差异均显著(图1B)。基因*PbGH3.4*在'玉露香梨'各个组织部位表达由高到低的顺序依次为:脱萼果果肉>萼片>脱萼萼筒>宿萼果果皮>叶芽>花瓣>宿萼果果肉>脱萼果果皮>宿萼萼筒>叶片,其中在脱萼果果肉中表达最高。与此同时,与其它各组织比较,均存在显著差异(图1C)。此外,发现'玉露香梨'基因*PbGH3.3*和*PbGH3.4*二者均在叶片组织中表达最低。对基因*PbGH3.3*在砀山酥梨组织表达分析发现,其在梨各个组织及果实发育不同时期中均有表达(图1D)。

2.2 '玉露香梨'PbGH3家族成员cDNA全长序列的克隆分析

提取梨果实萼片离区组织(图2A)RNA,反转录后并基于T-A克隆技术(图2B),成功克隆出2个家族成员*PbGH3.3*和*PbGH3.4*。以'玉露香梨'萼片离区组织为材料提取并反转录得到cDNA,经PCR扩增(图2C)检测测序,获得目的基因的全长CDS,长度均为1806 bp,起始密码子为ATG,终止密码子为TAA。编码蛋白分析发现存在7个氨基酸序列差异,如在1081 bp处存在G/A变异而导致编码的氨基酸不同(图2D和2E)。

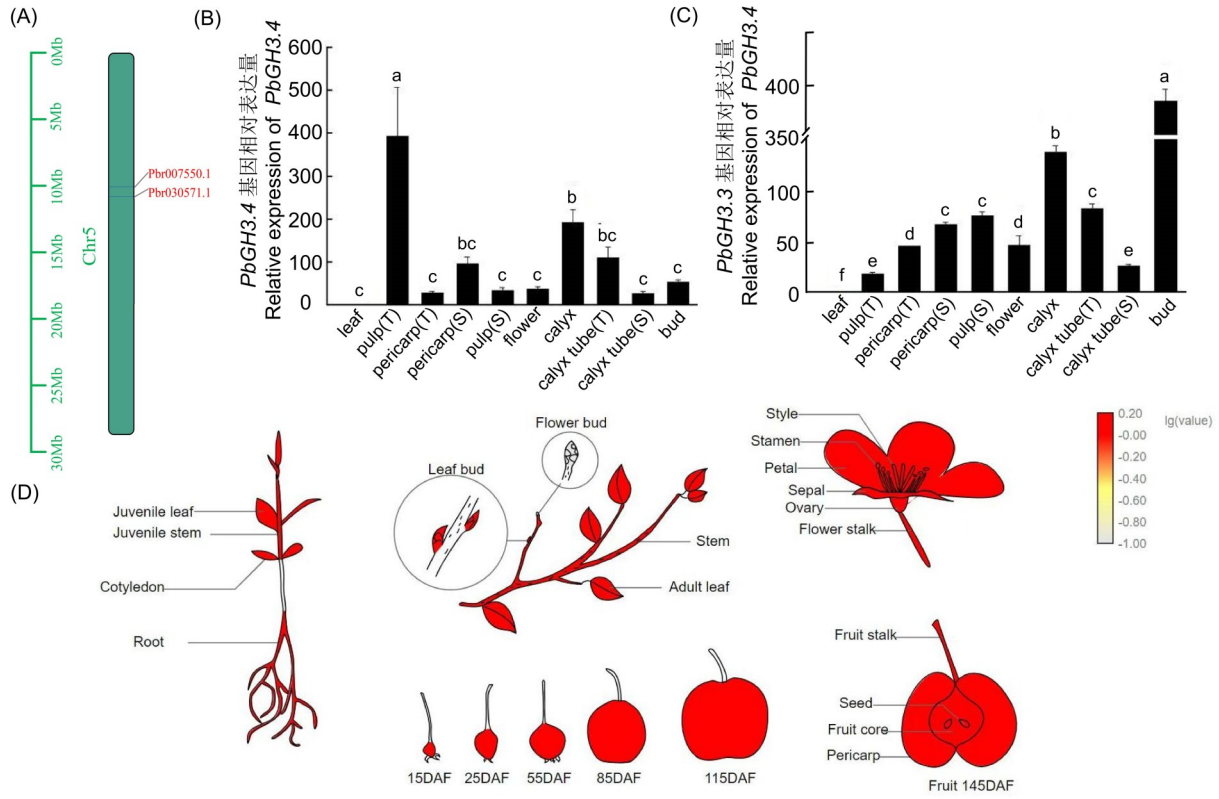
2.3 '玉露香梨'蛋白PbGH3.3和PbGH3.4进化树构建结果分析

PbGH3.3蛋白与苹果(XP_008373075.1)的同源性为97.84%,与甜樱桃(XP_021827312.1)的同源性为92.15%,与李(XP_008236406.1)的同源性为91.82%,与桃(XP_007199763.1)的同源性为91.82%,与杏(XP_034228093.1)的同源性为91.65%;PbGH3.4与苹果、甜樱桃、李、桃和月季的相似性分别为97.17%、92.49%、92.49%、92.49%和87.85%。利用MEGA 7.0,PbGH3.3和PbGH3.4蛋白与其他蔷薇科等15种物种的系统进化结果发现'玉露香梨'PbGH3二者蛋白与苹果MdGH3.1的同源性最高(图3B)。

2.4 '玉露香梨'PbGH3.3和PbGH3.4蛋白特性分析

PbGH3.3和PbGH3.4均编码601个氨基酸,蛋白分子式均为$C_{5319}H_{8834}N_{1806}O_{2178}S_{520}$,相对分子质量均是14.96 kDa,等电点相同为4.90,同时编码氨基酸内的负电荷残基(Asp+Glu)和正电荷的残基(Arg+Lys)均为0。此外,PbGH3.3和PbGH3.4蛋白的半衰期均为10 h,表现为不稳定,而蛋白质不稳定性指数(II)、脂肪指数和亲水性的平均值(GRAVY)分别为43.33与54.41、86.96与24.75、－0.237与0.916,其中前者蛋白为亲水性,后者则为疏水性。

PbGH3.3与PbGH3.4主要分别由37.10%与38.27%的α-螺旋、6.32%与5.16%的β-折叠、42.26%与41.93%的无规则卷曲以及14.31%与4.64%的延伸链组成(图4A和4B)。蛋白质结构



(A):染色体定位;(B~C):*GH3. 3* 和 *GH3. 4* 在'玉露香梨'不同组织部位表达量,leaf:叶片;pulp(T):脱萼果果肉;pericarp(T):脱萼果果皮;pericarp(S):宿萼果果皮;pulp(S):宿萼果果肉;flower:花瓣;calyx:萼片;calyx tube(T):脱萼萼筒离区部位;calyx tube(S):宿萼萼筒离区部位;bud:叶芽;不同小写字母表示 在 $P<0.05$ 的显著性差异水平,n=3;(D) *PbGH3. 3* 在砀山酥梨组织及不同发育时期表达;Petal:花瓣;Ovary:子房;Sepal:萼片

(A): Chromosomal localization; (B~C): Expression of *GH3.* 3 and G*H3. 4* at different tissues in 'Yuluxiangli', leaf: Leaf; pulp (T): Detached calyx fruit pulp; pericarp (T): Detached calyx fruit skin; pericarp (S): Persistent calyx fruit skin; pulp (S): Persistent calyx fruit pulp; flower: Petal; calyx: Sepals; calyx tube (T): Tissue away from the calyx tube; calyx tube (S): Tissue away from the calyx tube; bud: Leaf bud. Different lowercase letters represented significant differences at the level of $P< 0.05$, n=3. (D) Expression of *PbGH3. 3* in tissues and different developmental stages of 'Dangshansuli'

图 1　基因 *PbGH3.3* 和 *PbGH3.4* 染色体定位及其在'玉露香梨'不同组织表达特性

Fig.1　Chromosomal localization and expression characteristics of genes *PbGH3.3* and *PbGH3.4* at different tissues of 'Yuluxiangli'

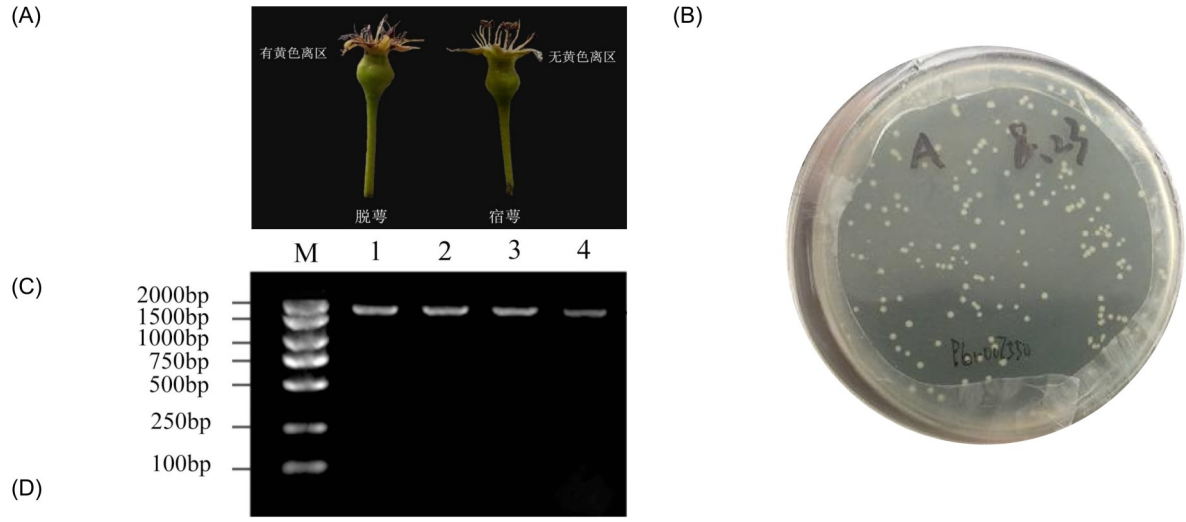
功能域预测其保守结构域发现,二者蛋白结构域中均具有 GH3 蛋白家族的 GH3 super family 保守结构域(图 4C 和 4D)。

蛋白 PbGH3.3 无信号肽(图 4E),而蛋白 PbGH3.4 存在信号肽(Sec/SPI)的可能性为 0.000 6(图 4F)。PbGH3.3 和 PbGH3.4 蛋白定位于细胞质、细胞核、线粒体、过氧化物酶体、内质网、溶酶体的可能性分别为 47.8% 与 45.0%、26.1% 与 0%、13.0% 与 10.0%、8.7% 与 30.0%、4.3% 与 0%、0% 与 10.0%。因此,预测二者定位于细胞质的可能性最大。

选取结构相似性最高的 VvGH3.1 蛋白(吲哚-3-乙酸烟酰胺基合酶)晶体结构(GMQE 为 84.56%,QMEAN 为 −1.17)建模(图 5A),PbGH3.3 和 PbGH3.4 蛋白质三级建模后发现,两者蛋白均为 GH3-1 AUXIN 缀合酶(图 5B 和图 5C),二者含有生长素稳态、无多聚体的形成,均具有 1xV1N 配体(图 5D)与 1x[((2S,3R,4R,5R)-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-3,4-(双氧化蒽基)氧杂戊基-2-基]2-(1H-吲哚-3-基)磷酸氢乙酯相同配体(图 5E),其中前者的 V1N.3 包括 4Å 内的 19 个残基和 16 种 PLIP 交互(图 5F),后者则有 18 种 PLIP 交互(图 5G)。

2.5　'玉露香梨'PbGH3.3 蛋白网络互作分析

PbGH3.3 全基因组的蛋白互作网络如图 6A 所示,节点数 11,边数 24,平均节点度 4.36,平均局部聚类系数为 0.762,PPI 富集 P 值为




```
PbGH3.3   1   MAVDSSLSPLGPPACDKDAKALQFIEETTRNADAVQERVLSEILARNAQTEYLKRFELGGATDRKTFKSKLPVITYEDLQPEIQRIANGDRAPILSAHPISEFLTSSGTSAAERKLMPTIQEELDRRQLLYSLLMPVMNLCVPGLDKGKG
PbGH3.4   1   ..........................................................................................S.....................G.....................................

PbGH3.3   151 LYFLFVKSETKTPGGLLARPVLTSYYKSEHFKTRPYDPYNVYTSPNEAILCPDSFQSMYAQMLCGLLEREKVLRLGAVFASGLLRAIRFLQLNWQQLAEDIRTGTLSSKITDPDLKSCIGGILKPDPELADFMSKQCGNENWDGILTRIW
PbGH3.4   151 ..........................................................................................H.....................................V.....................

PbGH3.3   301 PNTKYLDVIVTGAMAQYIPTLDYYSGGLPMACTMYASSECYFGLNLNPMCKPSEVSYTIMPNMAYFEFLPYEPNSVSGGGESGTRLVDLVEVEVGREYELVITTYAGLHRYRVGDILRVTGFHNSAPQFHFVRRKNVLLSIDSDKTDEAE
PbGH3.4   301 ..................................................I.Y.....................K.....................................................................

PbGH3.3   451 LQLAVDNASKLLKKFSASVVEYTSHADTTTIPGHYVIYWELLVKDSTNSESESFDSVMDQCCLTMEESLNSVYRQGRVADNSIGPLEIRVVKNGTFEELMDYAISRGASINQYKVPRCVNFTPIMELLDSRVISKHISPSLPHWTPERKM
PbGH3.4   451 ....................................................................................................................................................

PbGH3.3   601 R*  602
PbGH3.4   601 .*  602
```

(A)：‘玉露香梨’萼片离区组织；(B)：T－A克隆；(C)：M：DNA分子量标准；1－2：*PbGH3.3*基因CDS扩增产物；3－4：*PbGH3.4*基因CDS扩增产物；(D)：PbGH3.3和PbGH3.4氨基酸序列比对

(A)：Sepal exfoliation tissue of ‘Yuluxiangli’；(B)：T－A cloning；(C)：M：DNA maker；1－2：Amplified product of *PbGH3.3*；3－4：Amplified product of *PbGH3.4*.（D)：The comparison PbGH3.3 and PbGH3.4 homologous amino acid sequence

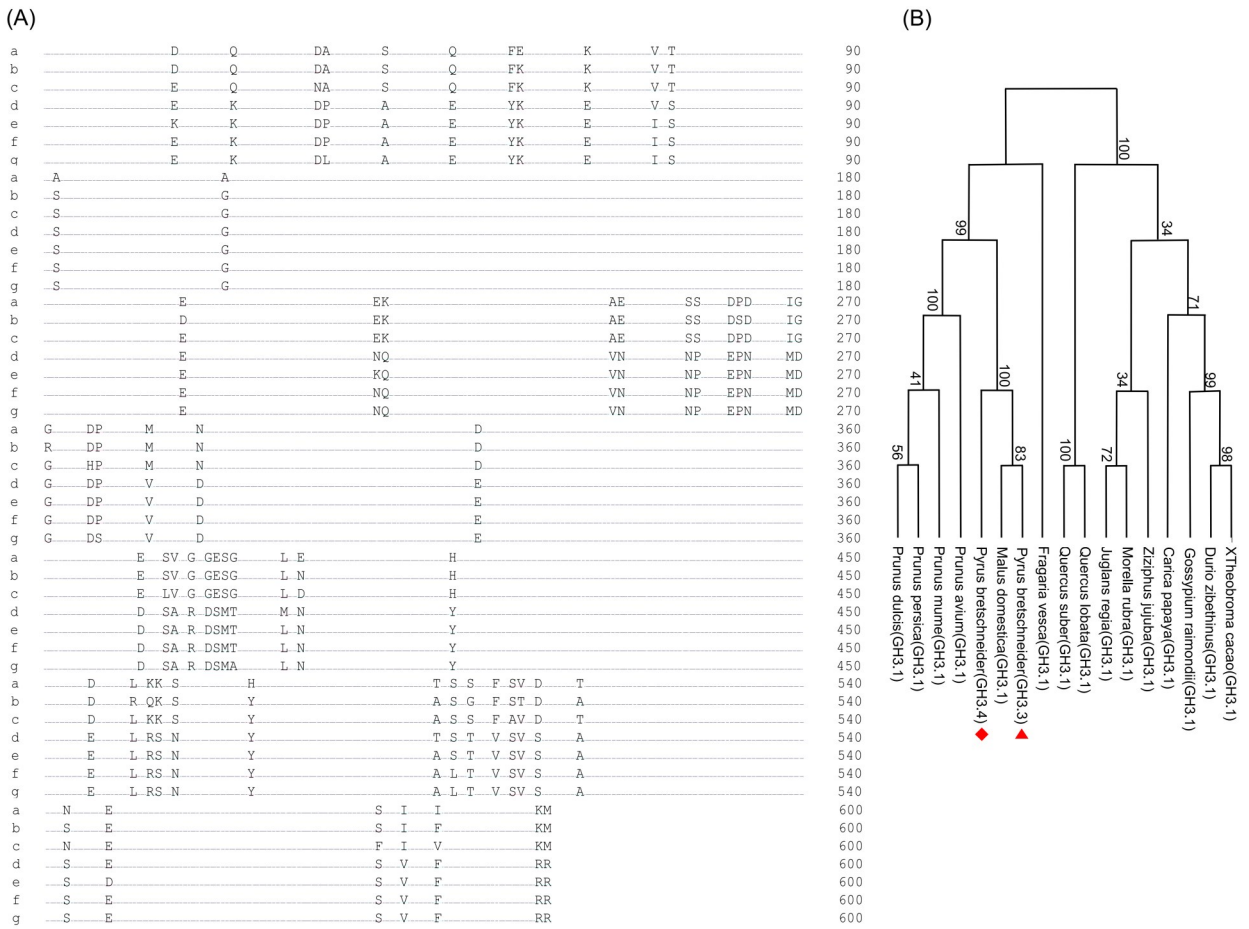
图2 *PbGH3.3*和*PbGH3.4*基因克隆及其氨基酸序列比较

Fig. 2 Amplified electrophoretic *PbGH3.3* & *PbGH3.4* and comparison sequence of their amino acid

1.37×10^{-4}。对互作基因GO功能分析发现，富集生物学过程前三的通路为激素介导的信号通路(GO：0009755，$4.26e^{-5}$)，细胞内信号转导(GO：0035556，$4.6e^{-4}$)和细胞分裂素激活的信号通路(GO：0009736，$4.6e^{-4}$)(图6B)；分子功能富集于酸性氨基酸连接酶活性(GO：0016881，$4.6e^{-4}$)。基因网络互作成员KEGG功能分析富集于植物信号转导通路(map04075，$5.33e^{-14}$)(图6C)。

3 讨论

生长素烟酰胺合成酶基因GH3在早期响应植物生长素信号通路发挥重要功能作用。曾文芳在对不同GH3基因协同控制桃果实各个发育阶段生长素动态平衡的研究中发现，*PpGH3.3*和*PpGH3.4*在果实成熟阶段明显表达上调，暗示它们可能参与了桃果实成熟衰老阶段的发育[16]。根据周苹的研究，*GH3.9*基因过表达植株中，雄蕊个数比雌蕊少且雄蕊明显偏短，不利于拟南芥的自花授粉，进而影响花器官衰败[17]。刘妮等研究指出低IAA水平有利于‘砀山酥梨’果实萼片脱落[4]。本实验‘玉露香梨’基因*PbGH3.3*在萼片中存在高表达，由于本实验萼片取样处于盛花末期，为梨果实萼片脱落临界期。因此，该时期基因*PbGH3.3*的高表达，可能诱导其萼片衰老脱落。本实验克隆的‘玉露香梨’基因PbGH3尤其*PbGH3.3*可能通过负调控IAA通路诱导梨果实萼片脱落。



(A): GH3蛋白同源氨基酸序列对比. a:梨 PbGH3.3; b:梨 PbGH3.4; c:苹果 MdGH3.1; d:甜樱桃 PaGH3.1; e:梅花 PmGH3.1; f:桃 PpGH3.1; g:月季 RcGH3.1;(B): GH3蛋白家族系统进化树

(A): GH3 protein homologous amino acid sequence comparison; a: PbGH3.3 (Pear); b: PbGH3.4 (Pear); c:MdGH3.1 (Apple); d: PaGH3.1 (Sweet cherry); e: PmGH3.1 (Plum); f: PpGH3.1 (Peach); g: RcGH3.1 (Rose); (B): Phylogenetic tree of GH3 protein family

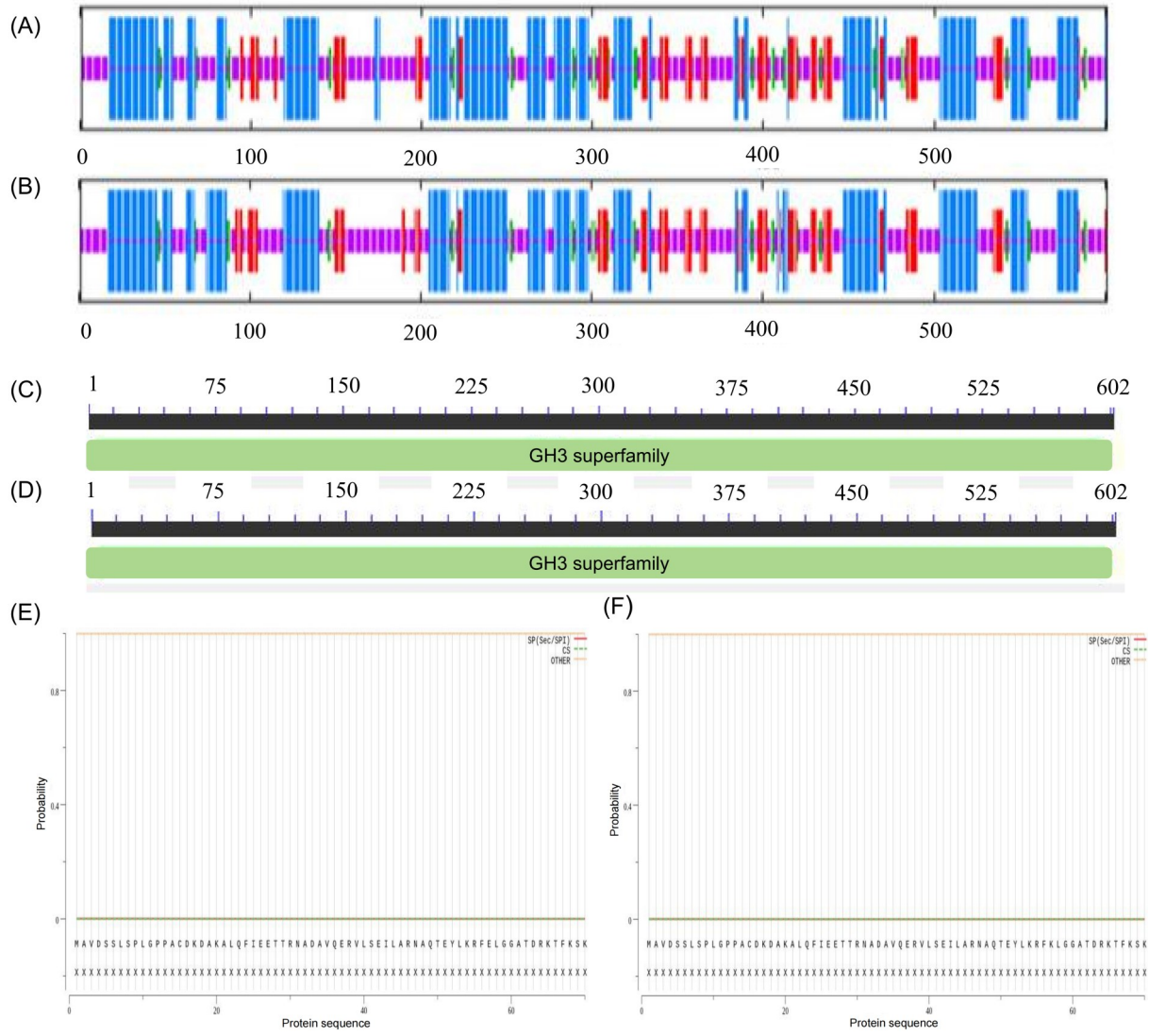
图3　PbGH3 氨基酸序列分析及系统发育树

Fig.3　Analysis of amino acid sequence and phylogenetic tree of PbGH3

‘玉露香梨’*PbGH3.3* 和 *PbGH3.4* 长度均为1806 bp,二者具有7个氨基酸序列的差异,编码601个氨基酸,进行同源性氨基酸序列对比后发现,与苹果、甜樱桃、李、桃、杏的同源性均在90%以上,表明PbGH3.3和PbGH3.4在进化上比较保守;对编码的蛋白结构域分析后发现PbGH3.3和PbGH3.4具有GH3 superfamily结构域,说明它们属于生长素烟酰胺合成酶类。不同物种基因 *GH3* 在序列长度、理化特性存在差异[18],但均具有保守的GH3结构域,与Ostrowski等人报道的结果一致,说明GH3蛋白家族在进化上存在保守结构域[19]。

‘玉露香梨’蛋白PbGH3.3和PbGH3.4无信号肽,说明2个蛋白属于非分泌蛋白;对蛋白的一级结构进行理化性质分析,发现本实验克隆的基因编码蛋白不具稳定性。蛋白质三级建模后发现PbGH3.3和PbGH3.4蛋白为GH3-1 AUXIN缀合酶,与VvGH3的吲哚-3-乙酸酰胺基合酶的晶体结构相似性最高,涉及生长素稳态,与前人研究结果一致,具有生长素结合特性[20]。

SignalP预测‘玉露香梨’PbGH3.3和PbGH3.4蛋白信号肽功能时,当预测分值大于阈值0.5时,默认为该蛋白含有信号肽;反之,分值小于阈值时,则不具信号肽[21-22]。‘玉露香梨’的PbGH3.4的生长素烟酰胺蛋白合成酶的蛋白信号肽(Sec/SPI)的预测分值是0.000 6,表明‘玉露香梨’的PbGH3.4序列含



(A)：PbGH3.3蛋白二级结构预测；绿色：β－折叠；蓝色：α－螺旋；红色：延伸链；紫色：无规则卷曲；(B)：PbGH3.4蛋白二级结构预测；(C)：PbGH3.3蛋白；(D)：PbGH3.4蛋白；(E)：PbGH3.3蛋白信号肽预测；(F)：PbGH3.4蛋白信号肽预测

(A)：Secondary structure prediction of protein PbGH3.3; Green：β－sheet; Blue：α－helix; Red：extended chain; Purple：random coil; (B)：Secondary structure prediction of protein PbGH3.4; (C)：PbGH3.3 protein; (D)：PbGH3.4 protein. (E) Prediction of PbGH3.3 protein signal peptide; (F) Prediction of PbGH3.4 protein signal peptide

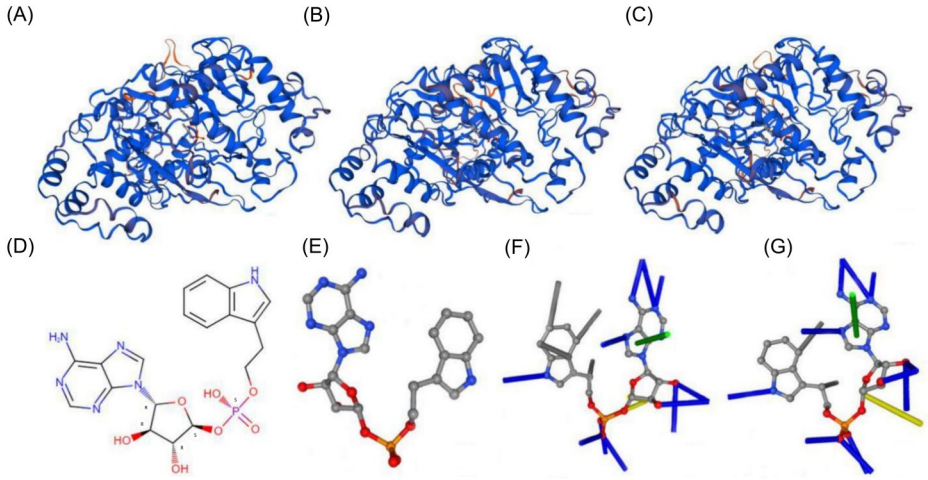
图4 ‘玉露香梨’PbGH3.3和PbGH3.4蛋白的二级结构及保守结构域预测

Fig. 4 Prediction of the secondary structure and conserved domains of PbGH3.3 and PbGH3.4 proteins in ‘Yuluxiangli’

有信号肽的可能性极低，不具备蛋白信号指引的功能。说明本实验克隆的‘玉露香梨’*PbGH3.3*和*PbGH3.4*基因属于编码生长素烟酰胺合成酶，但无信号肽功能。‘玉露香梨’PbGH3.3蛋白网络互作GO和KEGG功能富集分析表明其可能通过植物激素尤其是生长素信号通路参与梨果实组织的发育。

4 结论

基因*PbGH3.3*与*PbGH3*在‘玉露香梨’果实萼片等组织中存在差异表达，成功克隆出2个IAA信号通路关键生长素烟酰胺合成酶基因，明确了生长素酰胺合成酶基因GH3的2个关键基因生物信息特征，均含GH3 superfamily保守结构域，属GH3蛋白家族。本实验可为从生长素信号通路研究‘玉露香梨’萼片的脱落分子机理提供参考基因。基因*GH3*如何通过IAA通路影响萼片发育的机制有待进行更深入的功能验证。

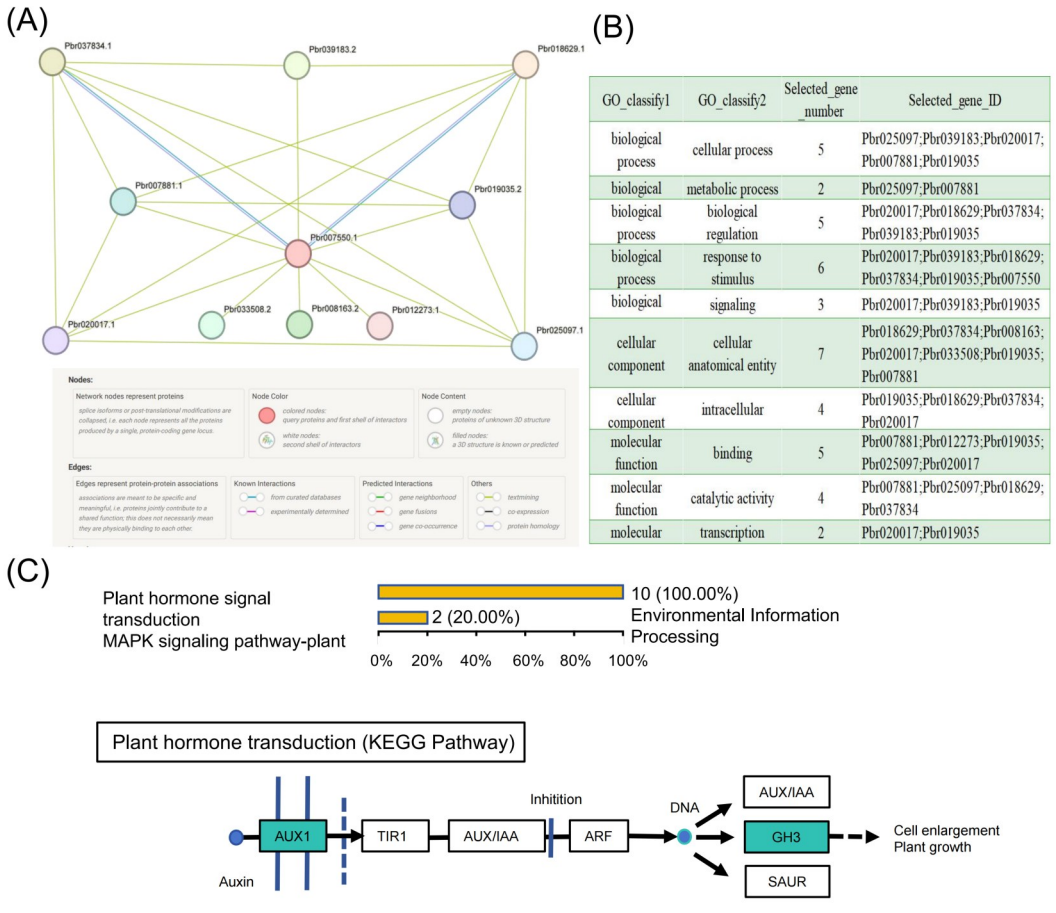


(A)：VvGH3.1蛋白三维模型；(B)：PbGH3.3蛋白三维模型；(C)：PbGH3.4蛋白三维模型；(D)：1xV1N配体；(E)：磷酸氢乙酯配体；(F)：18种PLIP交互结构之一；(G)：16种PLIP交互结构之一

(A)：Three-dimensional model of GH3.1 protein in *Arabidopsis*；(B)：Three-dimensional model of GH3.3 protein in ‘Yuluxiangli’；(C)：Three-dimensional model of GH3.4 protein in ‘Yuluxiangli’；(D)：1xV1N ligand；(E)：Hydrogen ethyl phosphate ligand；(F)：One of the 18 PLIP interaction structures；(G)：One of the 16 PLIP interaction structures

图5　PbGH3蛋白三维模型

Fig. 5　Three-dimensional model of PbGH3 protein



GO_classify1	GO_classify2	Selected_gene_number	Selected_gene_ID
biological process	cellular process	5	Pbr025097;Pbr039183;Pbr020017;Pbr007881;Pbr019035
biological	metabolic process	2	Pbr025097;Pbr007881
biological process	biological regulation	5	Pbr020017;Pbr018629;Pbr037834;Pbr039183;Pbr019035
biological process	response to stimulus	6	Pbr020017;Pbr039183;Pbr018629;Pbr037834;Pbr019035;Pbr007550
biological	signaling	3	Pbr020017;Pbr039183;Pbr019035
cellular component	cellular anatomical entity	7	Pbr018629;Pbr037834;Pbr008163;Pbr020017;Pbr033508;Pbr019035;Pbr007881
cellular component	intracellular	4	Pbr019035;Pbr018629;Pbr037834;Pbr020017
molecular function	binding	5	Pbr007881;Pbr012273;Pbr019035;Pbr025097;Pbr020017
molecular function	catalytic activity	4	Pbr007881;Pbr025097;Pbr018629;Pbr037834
molecular	transcription	2	Pbr020017;Pbr019035

(A)：PbGH3.3 String互作分析；(B)：GO功能富集；(C)：KEGG功能富集分析

(A)：Interaction of PbGH3.3 based on String.（B)：Function of GO enrichment.（C)：Function of KEGG enrichment

图6　PbGH3.3蛋白互作网络及功能富集

Fig. 6　PbGH3.3 protein interaction network and functional enrichment

致 谢

感谢大连理工大学的Noman Ali博士对本文英文摘要的修改润色。

We thank Dr. Noman Ali, from School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, 116024, Liaoning, People's Republic of China, for his revision in English abstract.

参 考 文 献

[1]张晓伟, 白牡丹, 郝国伟, 等. 玉露香梨生长期内干物质和氮磷钾元素积累规律分析[J]. 山西农业科学, 2020, 48(11): 1758-1762.
Zhang X W, Bai M D, Hao G W, et al. Analysis on the accumulation law of dry matter, nitrogen, phosphorus and potassium during the growth period of Yuluxiang pear [J]. Shanxi Agricultural Science, 2020, 48 (11):1758-1762.

[2]李晓梅, 郭黄萍, 黄军保. 玉露香梨及其在黄土高原地区建园技术[J]. 中国果树, 2004, 5(1): 23-24.
Li X M, Guo H P, Huang J B. Yuluxiang pear and its gardening technology in the Loess Plateau[J]. China Fruits, 2004, 5(1): 23-24.

[3]陆凤勤. 玉露香梨的引种表现及栽培技术要点[J]. 中国农业信息, 2015, 174(6):81-82.
Lu F Q. Introduction performance and cultivation techniques of Yuluxiang pear[J]. China Fruit News, 2015, 174(6): 81-82.

[4]刘妮, 陶书田, 张绍铃, 等. 授粉品种对'库尔勒香梨'果实萼片宿存及品质的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(3): 43-47.
Liu N, Tao S T, Zhang S L, et al. Effect of different pollinizer varieties on calyx retention and quality for 'Kuerlexiangli' fruit [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(3): 43-47.

[5]陈园园, 罗嘉亮, 李凯, 等. 梨脱萼果与宿萼果品质比较[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(1):15-21.
Chen Y Y, Luo J L, Li K, et al. Compatine studies on quality and texture of leaving calyx and persistent calyx fruits in pear [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2018, 33(1): 15-21.

[6]张光富, 李玲. 植物的萼片与苞片[J]. 生物学教学, 2011, 36(7):71.
Zhang G F, Li L. Sepals and bracts of plants [J]. Biology Teaching, 2011, 36(7):71.

[7]何子顺, 牛建新, 吴忠华, 等. 库尔勒香梨花萼发育规律研究[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(03):377-381.
He Z S, Niu J X, Wu Z H, et al. A Study on development law of calyx of Korla fragrant pear(*Pyrus brestschneideri* Rehd)[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2007, 44(03):377-381.

[8]木合塔尔·扎热. 库尔勒香梨树光能利用效率及宿萼果和粗皮果形成因子的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2012.
Muhetal Z A. Study on light use efficiency and related factors with calyx fruit and rough fruit of Korla Fragrant Pear [D]. Urumqi:Xinjiang Agricultural University, 2012.

[9]衡伟, 陈捷, 叶振风, 等. 砀山酥梨幼果花萼发育及其调控技术研究[J]. 合肥:安徽农业大学学报, 2010, 37(02):238-243.
Heng W, Chen J, Ye Z F, et al. Development of calyx and its controlling techniques of young fruit of Dangshansu pear [J]. Hefei:Journal of Anhui Agricultural University, 2010, 37(02): 238-243.

[10]陈园园, 李凯, 宋宇琴, 等. PBO对玉露香梨果实脱萼及品质的影响[J]. 中国南方果树, 2018, 47(5):55-58.
Chen Y Y, Li K, Song Y Q, et al. Effects of PBO on calyx falling and fruit quality of Yuluxiangli pear [J]. South China Fruits, 2018, 47(5):55-58.

[11]丁家鸣. 花期气温变化对库尔勒香梨脱萼果和宿萼果形成的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2015.
Ding J M. Effects of flowering temperature changes of abscisic calyx and persistent calyx fruit of Korla fragrant pear formation [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.

[12]Meir S, Hunter D A, Chen J C, et al. Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following auxin depletion in *Mirabilis Jalapa* [J]. Plant Physiology, 2006, 141(4):1604-1616.

[13]Zuo X, Xu T, Qi M, et al. Expression patterns of auxin-responsive genes during tomato flower pedicel abscission and potential effects of calcium [J]. Australian Journal of Botany, 2012, 60(1):68.

[14]丁保朋. 梨果实萼片对果形的影响及其发育相关基因分析[D]. 太谷:山西农业大学, 2020.
Ding B P. Study on the effect of the sepals of Pyrus fruit on fruit shape and its molecular mechanism [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2020.

[15]Qi X, Wu J, Wang L, et al. Identifying the candidate genes involved in the calyx abscission process of 'kuerlexiangli' (*Pyrus Sinkiangensis* Yu) by digital transcript abundance measurements[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):727.

[16]曾文芳, 潘磊, 牛良, 等. 桃GH3基因家族的生物信息学分析及其在果实发育中的表达[J]. 园艺学报, 2015, 42(05): 833-842.
Zeng W F, Pan L, Niu L, et al. Bioinformatics analysis of peach *GH3* gene family and its expression in fruit development [J]. Acta Horticulture Sinica, 2015, 42(05):833-842.

[17]周苹, 唐冬英, 郭明, 等. 拟南芥*GH3.9*基因的过表达及其表型分析[J]. 西北植物学报, 2015, 35(3):5.
Zhou P, Tang D Y, Guo M, et al. Overexpression and phenotype Analysis of *GH3.9* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(3):5.

[18]张晓峰, 焦锋, 聂浩, 等. 桑树*MaGH3.6*基因的克隆与诱导表达及时间特异性[J]. 蚕业科学, 2013(2):8.
Zhang X F, Jiao F, Nie H, et al. Cloning, induced expression and temporal specificity of *MaGH3.6* gene in Mulberry. Science of Sericulture, 2013(2):8.

[19]Ostrowski M, Mierek-Adamska A, Porowińska D E T, et al. Cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid-amino acid synthetase PsGH3 from pea. Plant Physiol Biochem. 2016, 107:9-20.

[20]Wei L J, Yang B, Jian H J, et al. Genome-wide identification

and characterization of Gretchen Hagen3 (GH3) family genes in *Brassica napus*[J]. Genome, 2019, 62(9):597 - 608.

[21]高利敏, 王鹏飞, 杜俊杰, 等. 欧李*ChCCD1*基因的克隆与生物信息分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(05):1426-1432.
Gao L M, Wang P F, Du J J, et al. Cloning and bioinformatics Analysis of *CCD1* gene in Cerasus humilis[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(05):1426-1432.

[22]邢磊, 郭园艺, 汪自庆, 等. 羊草GST基因的克隆及序列分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(5):48-56.
Xing L, Guo Y Y, Wang Z Q, et al. Cloning and bioinformatics analysis of GST gene of *Leymus chinensis*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 40(5):48-56.

Cloning and bioinformatics analysis of the auxin nicotinamide synthase genes GH3 in 'Yuluxiangli'

Ding Baopeng[1,2*], Li Xiaobai[3], Lin Yujing[2], Hu Chaohui[2], Yang Ru[2], Wei Bolin[2], Cao Yifan[2], Bai Yulin[2], Yan Ruyu[2], Li Liulin[2*]

(*1.Engineering Research Center of Coal-Based Ecological Carbon Sequestration Technology of the Ministry of Education and Key Laboratory of National Forest and Grass Administration for the Application of Graphene in Forestry, Shanxi Datong University, Datong 037009, China; 2.College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China; 3.Datong comprehensive inspection and testing center, Datong 037009, China*)

Abstract: [Objective] The persistent sepals of 'Yuluxiangli' pear fruits significantly reduces its commercial value. This study aimed to screen and identify key genes involved in sepal development to provide reference genes for molecular breeding of pear fruits with sepal abscission at the molecular level. [Method] 'Yuluxiangli' cultivated in vertical trellis was used as tested material. Based on previous BSA gene mapping and sequencing data, the expression characteristics of candidate genes were verified, and two auxin-amido synthetase genes, GH3 family, were cloned and analyzed for their bioinformatics characteristics. [Result] The genes *PbGH3.3* (*Pbr007550*) and *PbGH3.4* (*Pbr030571*) ranked second in expression level in the sepals. The CDS lengths of *PbGH3.3* and *PbGH3.4* were both 1806 bp, encoding 601 amino acids. There were seven amino acid sequence differences between them, and the encoded protein PbGH3.3 and PbGH3.4 showed the highest homology with MdGH3.1 in apple. They were unstable proteins without signal peptides and were located in the cytoplasm; Analysis using the CCD tool on the NCBI website revealed that they both possessed the conserved domain GH3 superfamily of GH3 protein family. Protein tertiary structure modeling showed that they were GH3.1 Auxin amido synthetase involved in auxin homeostasis, belonging to the GH3 protein family. Functional enrichment analysis of GO and KEGG pathways of STRING protein interaction network members indicated that PbGH3.3 is involved in the plant hormones, especially auxin signaling pathway. [Conclusion] It was suggested that PbGH3.3 and PbGH3.4 might play a biological roles in the regulating of sepal in 'Yuluxiangli' fruits through the IAA signaling pathway.

Keywords: Pear, Sepals, Auxin nicotinamide synthase, Gene cloning, IAA

(编辑:吕俊俐)