

桃 Aux/IAA 家族基因鉴定及在果实成熟过程中的表达分析

曾文芳, 王小贝, 潘磊, 牛良, 鲁振华, 崔国朝, 王志强*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 国家桃葡萄改良中心, 农业部果树育种技术重点实验室, 郑州 450009)

摘要: 通过生物信息学鉴定桃基因组中生长素/吲哚乙酸 (Aux/IAA) 基因家族, 并对其在溶质型和硬质型桃果实成熟阶段的表达水平进行 qRT-PCR 检测。结果表明: 桃 Aux/IAA 基因家族包含 22 个成员, 这些基因集中分布在 5 条染色体上, 以第 1 条染色体上含有最多, 为 8 个。大部分 Aux/IAA 基因包含高度保守的 I、II、III 和 IV 功能域, 聚类分析表明其分为 10 类。基因结构分析显示这些基因包含 2~5 个外显子。荧光定量 PCR 分析表明 10 个 Aux/IAA 基因在溶质型桃果实的表达量高于对应时期硬质型桃果实, 其中 5 个基因随着溶质型桃果实的成熟上调表达, 特别是 *ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m*。试验结果表明桃 Aux/IAA 家族成员在结构上高度保守, 其中多个成员 (尤其是 *ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m* 等) 可能参与调控桃果实的成熟。

关键词: 桃; 生长素/吲哚乙酸基因; 果实成熟; 生长素

中图分类号: S 662.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 02-0233-12

Identification and Expression Profiling of Aux/IAA Family Gene During Peach Fruit Ripening

ZENG Wenfang, WANG Xiaobei, PAN Lei, NIU Liang, LU Zhenhua, CUI Guochao, and WANG Zhiqiang*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Peach and Grape Improvement Center, Key Laboratory of Fruit Breeding Technology of Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: Auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) is involved in plant growth, development, and multiple other processes. In this study, the Aux/IAA gene family in the peach genome was identified and analyzed by bioinformatics, additionally, the expression levels of Aux/IAA genes were detected by qRT-PCR in melting-flesh and stony-hard peach fruits during fruit ripening. The results showed that 22 *PpAux/IAA* candidate genes were found in the peach genome. A chromosome mapping analysis revealed that *PpAux/IAA* genes were distributed with different densities over 5 chromosomes, with the largest number of *PpAux/IAA* genes on chromosome 1 (8 genes). The DNA-binding and Aux/IAA domains, as well as motif I, II, III and IV of the *PpAux/IAA* gene family were highly conserved. The phylogenetic analysis revealed that *PpAux/IAA* gene family was divided into 10 groups. The results of an intron-exon

收稿日期: 2016-08-23; 修回日期: 2017-01-24

基金项目: 河南省科技厅基础前沿项目 (152300410137); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2017-ZFRI); 国家自然科学基金项目 (31501732)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wang6399@126.com; Tel: 0371-65330988)

structure analysis indicated that *PpAux/IAA* gene family members were composed of 2 - 5 exons. qRT-PCR results indicated that the expression level of ten *PpAux/IAA* genes in melting-flesh peach fruits were higher than in stony-hard peach fruits, and the expression level of 5 genes were upregulated in melting-flesh fruits during fruit ripening, especially for *ppa010303m*, *ppa010871m*, and *ppa020369m*. These results suggested that the *PpAux/IAA* gene family members are highly and structurally conserved, and some of them (especially for *ppa010303m*, *ppa010871m* and *ppa020369m*) are involved in regulating peach fruit ripening.

Keywords: peach; *Prunus persica*; Aux/IAA gene family; fruit ripening; indole-3-acetic-acid

桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 果实一般为溶质型 (melting flesh), 属于呼吸跃变型果实, 在乙烯的作用下迅速软化, 达到商品成熟 (吴敏 等, 2003), 而硬质型桃果实成熟期 (stony hard) 乙烯合成受阻, 果实不变软 (Haji et al., 2001, 2003; Tatsuki et al., 2006)。Tatsuki 等 (2013) 比较溶质型和硬质型桃成熟期果实发现, 两者间不仅乙烯释放量存在差异, 同时生长素积累也存在明显的差异, 且硬质型桃乙烯合成受阻可能是由于其生长素 (IAA) 的水平较低。采用生长调节剂萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid, NAA) 处理硬质桃果实可以诱导 *ACSI* 表达迅速提升, 从而产生大量乙烯, 果实变软 (Tatsuki et al., 2013; 曾文芳 等, 2015)。

生长素通过对 Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) 蛋白水平的调节进而快速诱导一系列的生长素响应基因表达。Aux/IAA 家族的基因属于生长素原初反应基因, 编码半衰期较短的核定位蛋白质。大量研究表明这些核定位蛋白在生长素信号传导过程中通过与生长素响应因子 (auxin response factor, ARF) 形成异源二聚体而起到抑制信号转导的作用 (Abel & Thedogis, 1995; Leyser, 2002; Quint & Gray, 2006)。Aux/IAA 基因首先在豌豆中被发现 (Walker & Key, 1982)。在拟南芥中共有 29 条 Aux/IAA 基因被报道分布在所有的 5 条染色体上 (Liscum & Reed, 2002)。大部分的 Aux/IAA 包含高度保守的 I、II、III 和 IV 功能域 (Abel & Thedogis, 1995; Tiwari et al., 2001)。功能域 I 被证明是一个抑制功能域, 而功能域 II 是与生长素受体 (auxin transport inhibitor response 1, TIR1) 相互作用的功能域 (Dharmasiri et al., 2005), 缺失此功能域的 Aux/IAA 蛋白有更长的半衰期且对生长素也不敏感 (Gray et al., 2001)。功能域 III 和 IV 则介导 Aux/IAA 蛋白之间, 或者 Aux/IAA 蛋白和 ARF 蛋白之间同源或者异源二聚体的互作 (Kim et al., 1997; Ulmasov, 1997; Hardtke et al., 2004)。

Aux/IAA 家族基因在果实发育的各个阶段均起着十分重要的作用 (Pattison et al., 2014)。在番茄中, 沉默 *SILAA9* 基因会引起单性结实, 同时单叶替代了复叶 (Wang et al., 2005; Mazzucato et al., 2015)。同样是在番茄中, 沉默 *SILAA27* 基因不仅引起了单性结实, 果实的大小和形状也发生了改变 (Bassa et al., 2012)。近来沉默番茄的 *SILAA17* 基因研究发现, 相对于野生型, 转基因植株果实细胞明显增大, 果皮增厚, 果实变大, 同时果实可溶性固形物、pH 值、硬度均发生改变 (Su et al., 2014, 2015)。前人关于 Aux/IAA 基因的研究主要以果实的生长发育居多, 针对果实成熟过程中 Aux/IAA 的研究鲜有报道。Trainotti 等 (2007) 通过芯片检测发现桃果实成熟过程中 Aux/IAA, 生长素受体等生长素相关基因表达量上调, 表明桃果实成熟过程会响应生长素信号。

围绕溶质型桃 (‘中油桃 13 号’和‘黄金蜜 3 号’) 与硬质型桃 (‘中油桃 16 号’和‘Yumyeong’) 的对比研究, 发现果实成熟期乙烯释放量和生长素积累水平表现出明显的差异 (Pan et al., 2015; Zeng et al., 2015)。本研究中以两对溶质型和硬质型桃成熟阶段的果实为试材, 对桃基因组中的 Aux/IAA 基因家族进行生物信息学和表达分析, 明确该基因家族序列特征及在两种肉质类型桃果实

成熟阶段的表达特征, 为进一步研究该基因家族在桃果实成熟过程中扮演的角色奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以中国农业科学院郑州果树研究所桃育种圃保存的溶质型桃品种‘中油桃 13 号’和‘黄金蜜 3 号’以及硬质型桃品种‘中油桃 16 号’和‘Yumyeong’为试材。2014 年 6 月采集第 2 次膨大期 (S3-1、S3-2) 和生理成熟期 (S4-1、S4-2) 的果肉样品。

‘中油桃 13 号’采样 4 次, 分别是 6 月 4 日 (花后 70 d, S3-1)、6 月 13 日 (花后 79 d, S3-2)、6 月 24 日 (花后 90 d, S4-1) 和 6 月 30 日 (花后 96 d, S4-2)。

‘中油桃 16 号’采样 4 次, 分别是 5 月 25 日 (花后 60 d, S3-1)、6 月 4 日 (花后 70 d, S3-2)、6 月 13 日 (花后 79 d, S4-1) 和 6 月 21 日 (花后 87 d, S4-2)。

‘黄金蜜 3 号’和‘Yumyeong’采样 4 次, 分别是 7 月 14 日 (花后 110 d, S3-1)、7 月 19 日 (花后 115 d, S3-2)、7 月 26 日 (花后 122 d, S4-1) 和 7 月 30 日 (花后 127 d, S4-2)。

样品采后立即用液氮冰冻处理, -80°C 保存备用。各时间点对应的果实硬度, 生长素含量和乙烯释放量见 Zeng 等 (2015) 和 Pan 等 (2015) 的文献。

1.2 桃 Aux/IAA 家族成员的序列分析、在染色体上的分布分析和进化树的构建

利用 phytozome 基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/search.php>) 中的 Keyword search 检索 (Verde et al., 2013), 以 PF02309 为关键词获得桃基因组已注释的 Aux/IAA 蛋白序列, 并分析氨基酸长度。

采用 MapInspect 分析 Aux/IAA 家族成员在染色体上的分布。

利用 Gene Structure Display Server (<http://gsds1.cbi.pku.edu.cn/>) 对基因结构进行分析。

利用 SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) 和 DBSubLoc (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/~guotao/intro.html>) 对蛋白进行信号肽及亚细胞定位的预测; 蛋白质结构域采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行预测; 分子量及等电点用 ExPASy Compute pI/Mw 程序 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 计算。

采用 ClustalX 1.83 对桃 Aux/IAA 蛋白家族序列进行序列比对 (alignment)。

使用 MEGA 4.0 软件 (Tamura et al., 2007) 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 其他参数为系统默认值。

1.3 数字表达谱测序

采用数字化基因表达谱测序技术筛选差异表达的 Aux/IAA 基因。

提取‘黄金蜜 3 号’和‘Yumyeong’4 个发育时期的果实样品总 RNA, 送交北京诺禾致源生物科技有限公司, 基于 illumina HiSeq 2500 技术测序平台构建常规转录组文库进行 SE50 单端测序, 获得 8 个桃的 DGE 测序数据。每个样品个体的测序数据量不少于 6 M 的 cleanreads 序列, 对测序得到的原始 reads (单端序列) 进行数据评估, 并将 reads 序列与参考基因序列 (桃基因组数据库 http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/prunus_persica/) 比对, 同时将 reads 数量进行 RPKM 均一化 (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads, 每 1 百万个 map 上的 reads 中 map 到外显子的每 1K

个碱基上的 reads 个数) (Mortazavi et al., 2008), 基于 Aux/IAA 家族基因的 RPKM 结果 (Pan et al., 2015), 采用 Multiple Array Viewer 软件绘制热图, 同时对与 *ACSI* (*ppa004774m*) 和 *YUCCA11* (*ppa008176m*) 基因表达类似的基因进行聚类。

1.4 荧光 PCR 检测

果肉组织的 RNA 提取采用多糖多酚总 RNA 提取试剂盒 SK8662 (生工, 上海) 的方法进行。采用反转录试剂盒 KR106 (天根, 北京) 合成 cDNA 第一链, 并以此为模板, 使用 Light-Cycler 480II 荧光定量仪进行 qPCR 检测, 采用 SYBR Green I Master 试剂盒 (Roche, 瑞士) 进行扩增反应。反应总体积 15 μL , 包含 100 ng cDNA (1 μL), 2 \times Lightcycler 480 SYBR Green I Master (7.5 μL), 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上、下游引物 (各 0.75 μL) 和无 RNA 酶水 (5 μL)。反应程序 (曾文芳 等, 2015), 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 45 个循环。每个样品 3 次重复。采用 Primer Express 3.0 分别对各个转录本序列的设计特异性引物 (表 1), 引物由上海生工合成。

选取 *Actin* (*ppa007242m*) 作为内参基因 (Brandi et al., 2011), 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算基因相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

表 1 实时定量 PCR 引物
Table 1 Real-time quantitative PCR primers

一代桃基因组登录号 <i>Prunus persica</i> v1.0 number	二代桃基因组登录号 <i>Prunus persica</i> v2.0 number	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>ppa011843m</i>	<i>Prupe.8G232400</i>	CCACACACAAGCTTTAATGAAAGAC	CCAAGCAAAATTAAGGAGTTCCA
<i>ppa011821m</i>	<i>Prupe.1G208300</i>	TTTTGTCTAGTGGTGGTTCATAACT	GATGCAGCCCCAAACTATGTATT
<i>ppa011755m</i>	<i>Prupe.6G343700</i>	TCGTGCAAGAGGTTGAGAATCA	CACAGCGCGCAGCCTAA
<i>ppa011570m</i>	<i>Prupe.3G074900</i>	CGGCTCCGGTTGATGAAA	TTGGAGGTGTCCTTGGAGCTA
<i>ppa010871m</i>	<i>Prupe.7G247500</i>	TGCATTGACCCACCTTGTA	GCAITGTTGCAAAACACACACAAC
<i>ppa010698m</i>	<i>Prupe.1G027600</i>	CGCTGTGTCCAAGAGATGGA	CCATCGCATAAAAATACAGACACAT
<i>ppa010683m</i>	<i>Prupe.1G481700</i>	CCCTGGCAAACCTTCATCAA	TCATCAACCTCCTTTCTCAGTATC
<i>ppa010342m</i>	<i>Prupe.8G232200</i>	CCACAGCCTGCTCCTTGAT	GTTTGGTGGTTTGGTTTATTGC
<i>ppa020369m</i>	<i>Prupe.3G001800</i>	CTGGTCGTGATGTTTCATGTTTTG	CCCCACCATCAGCCAATC
<i>ppa006744m</i>	<i>Prupe.1G540700</i>	CAACCGCAGCAACCAGATAA	CCATCCAGCCCCACTCAAC
<i>ppa009545m</i>	<i>Prupe.1G049200</i>	TCTTCTGGTAGGCCATATTGTTTTT	GCAGGCTGTATGCTAGCACTA
<i>ppa010303m</i>	<i>Prupe.7G234800</i>	GGCTGTTGGGATAGCTCCAA	GCTTGATCAGTACCATTCAITTCATT
<i>ppa018535m</i>	<i>Prupe.1G027500</i>	CTGGATGCTGGTTGGAGATGT	TCTCAGTCTTCTGCAGGATGAC
<i>ppa011935m</i>	<i>Prupe.3G074800</i>	TCCCTTGGGAGATGTTTATTGAG	TGGCATCCGATCTCTTCATG
<i>ppa007242m</i>	<i>Prupe.6G163400</i>	GATTCCGGTGCCAGAAAGT	CCAGCAGCTTCCATTCCAA

2 结果与分析

2.1 桃 Aux/IAA 基因家族的全基因组鉴定、在染色体的定位和氨基酸序列分析

通过 phytozome 基因组数据库以 PF02309 为关键词检索到桃 Aux/IAA 家族 22 个基因 (表 2), 编码的氨基酸长度为 162 ~ 413 aa。ProtParam 分析显示 Aux/IAA 家族的蛋白分子量为 17.98 ~ 44.22 kD, 等电点 4.89 ~ 9.30。

亚细胞定位预测它们定位于细胞核, 且不含跨膜区和信号肽。

SMART 分析 Aux/IAA 家族的蛋白质包含 4 个（I、II、III和IV）保守结构域。ClustalX 比对发现几乎所有的 Aux/IAA 蛋白家族包含完整的结构域 I、II、III和IV，仅 ppa018956m 缺失了结构域 I（图 1）。

Aux/IAA 基因在桃基因组染色体上的分布见表 2 和图 2，22 个成员分布在桃基因组 8 条染色体骨架中 5 条上，每条染色体上的基因数从 3 个到 8 个不等。其中第 1 号染色体最多，有 8 个；第 3 号染色体有 5 个；第 6、7 和 8 号染色体上各有 3 个。

表 2 桃基因组中 Aux/IAA 蛋白家族的特征
Table 2 Characteristics of Aux/IAA family in peach genome

二代桃基因组登录号 <i>Prunus persica</i> v2.0 number	一代桃基因组登录号 <i>Prunus persica</i> v1.0 number	定位染色体 Chromosome number	预测的蛋白 Predicted protein		
			氨基酸长度/aa Length	分子量/kD Molecular weight	等电点 Isoelectric point
<i>Prupe.1G540700</i>	<i>ppa006744m</i>	1	397	43.43	6.68
<i>Prupe.6G210500</i>	<i>ppa007194m</i>	6	378	40.87	6.56
<i>Prupe.3G064200</i>	<i>ppa007893m</i>	3	343	38.43	6.96
<i>Prupe.7G225600</i>	<i>ppa009134m</i>	7	321	32.41	6.84
<i>Prupe.8G232200</i>	<i>ppa010342m</i>	8	253	27.88	6.76
<i>Prupe.6G343800</i>	<i>ppa009254m</i>	6	255	33.23	5.11
<i>Prupe.1G027600</i>	<i>ppa010698m</i>	1	248	26.60	8.10
<i>Prupe.6G343700</i>	<i>ppa011755m</i>	6	197	22.38	7.49
<i>Prupe.1G027500</i>	<i>ppa018535m</i>	1	196	22.03	6.22
<i>Prupe.8G232400</i>	<i>ppa011843m</i>	8	193	21.71	5.96
<i>Prupe.3G074900</i>	<i>ppa011570m</i>	3	243	22.49	7.56
<i>Prupe.7G234800</i>	<i>ppa010303m</i>	7	255	28.41	8.22
<i>Prupe.3G074800</i>	<i>ppa011935m</i>	3	190	21.30	7.61
<i>Prupe.3G058600</i>	<i>ppa007663m</i>	3	360	39.74	8.96
<i>Prupe.8G215400</i>	<i>ppa008953m</i>	8	313	32.63	6.84
<i>Prupe.1G049200</i>	<i>ppa009545m</i>	1	413	44.22	8.72
<i>Prupe.7G247500</i>	<i>ppa010871m</i>	7	232	26.49	9.00
<i>Prupe.1G481700</i>	<i>ppa010683m</i>	1	240	27.03	9.30
<i>Prupe.1G317000</i>	<i>ppa023002m</i>	1	194	22.35	4.89
<i>Prupe.1G208300</i>	<i>ppa011821m</i>	1	195	21.20	6.49
<i>Prupe.3G001800</i>	<i>ppa020369m</i>	3	213	21.40	5.48
<i>Prupe.1G085900</i>	<i>ppa018956m</i>	1	162	17.98	9.24

2.2 桃 Aux/IAA 蛋白家族相似性和进化树分析

利用进化树分析软件 MEGA4.0 对桃的 22 个 Aux/IAA 基因构建进化树（图 3），这些基因可以分为 A、B、C、D、E、F、G、I、J 和 K 共 10 组，分别含有 3、4、3、1、2、1、2、3、2 和 1 个成员。

通过 Aux/IAA 家族基因 CDS 区域的碱基序列与基因组序列比对得到各个基因外显子和内含子在 DNA 序列上的分布（图 3）。各个基因都含有的内含子数从 1 到 4 不等。来自 B、C、E、F 和 G 这 5 个组的基因都含有 5 个外显子，4 个内含子；A 和 D 两组的基因含有 3 个外显子和 2 个内含子；I 和 J 两组的基因均含有 4 个外显子和 3 个内含子；K 组的基因含有 2 个外显子和 1 个内含子。

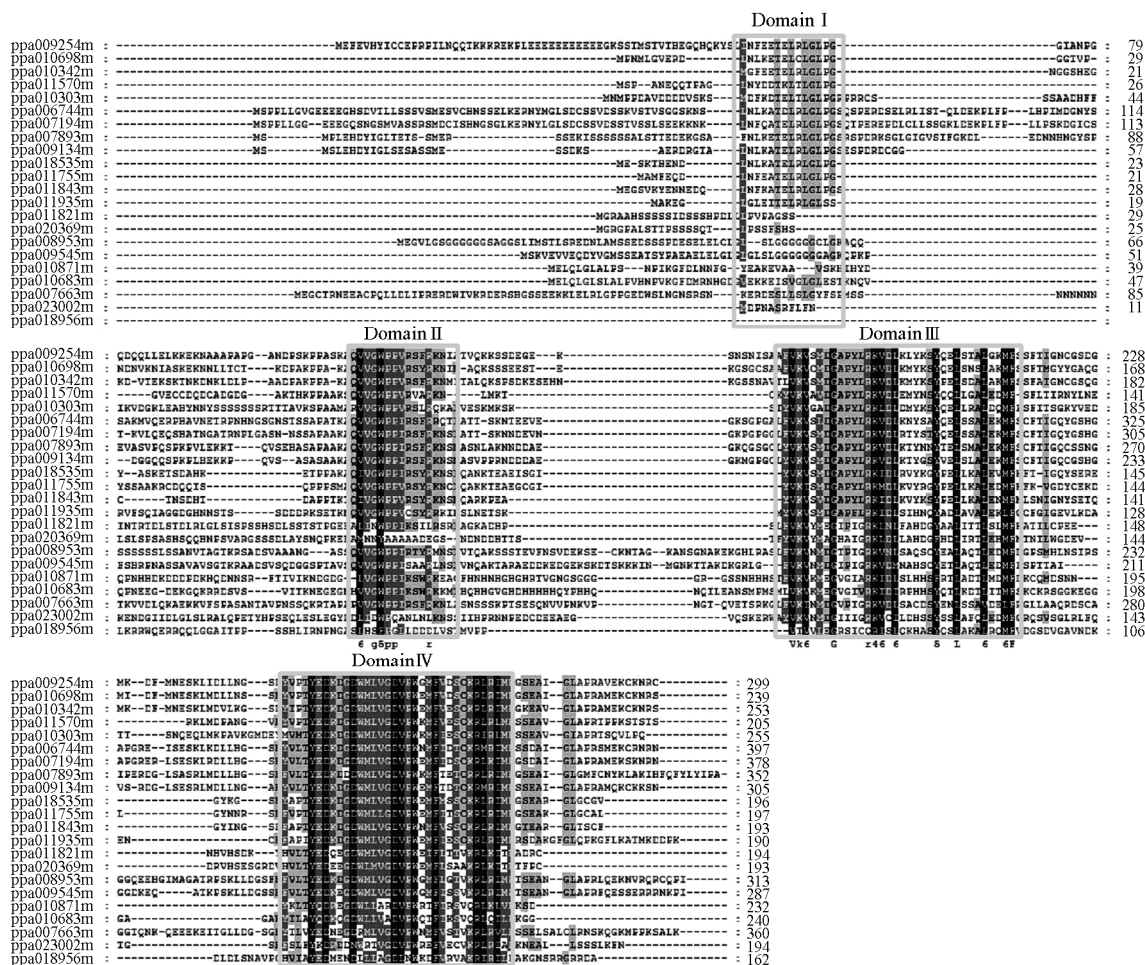


图 1 桃 Aux/IAA 蛋白家族序列比对

Fig. 1 Multiple alignments of peach Aux/IAA proteins

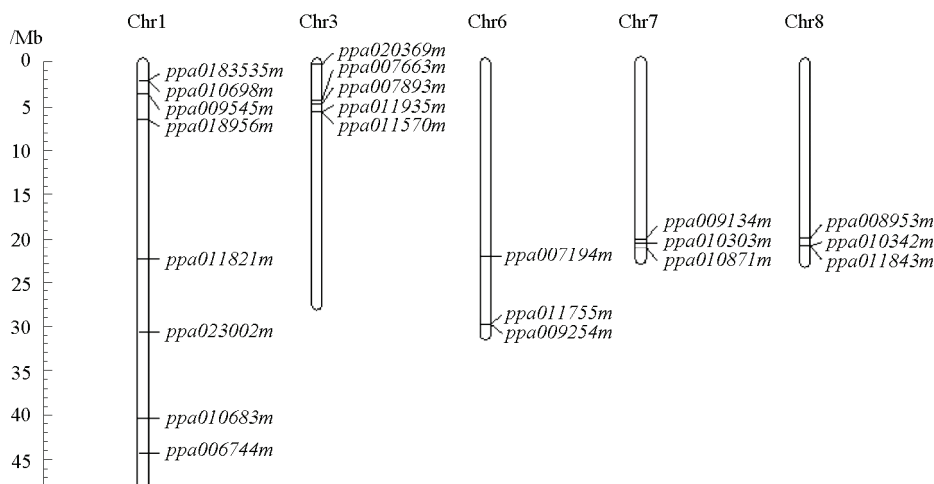


图 2 桃 Aux/IAA 基因在染色体上的分布

Fig. 2 Genomic distribution of Aux/IAA genes on peach chromosomes

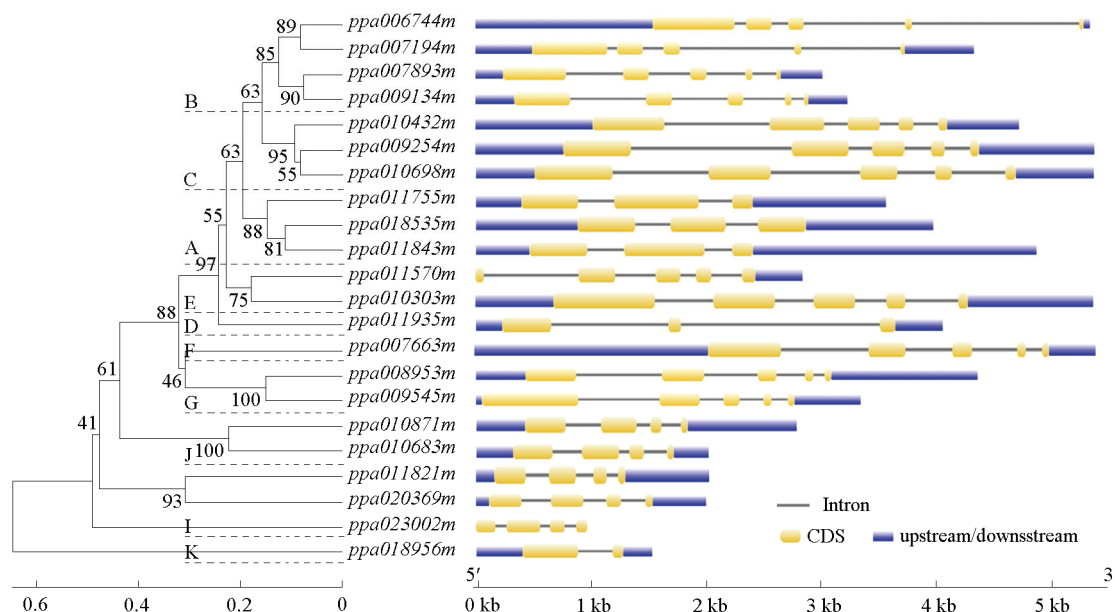


图3 桃 Aux/IAA 的进化关系和结构

进化树由 MEGA4.0 的邻接法绘制, 参数设置在 1 000 次重复。黄色代表外显子, 细线代表内含子, 蓝色代表编码区上下游的非翻译区。

Fig. 3 Structure and phylogenetic relationship of peach Aux/IAA proteins

The unrooted tree was generated using MEGA4.0 program by Neighbor-Joining method. Bootstrap values from 1 000 replicates are indicated at each branch. The exons are represented by yellow boxes, the introns are represented by lines, and upstream/downstream regions are represented by blue boxes.

2.3 桃 Aux/IAA 基因在溶质型和硬质型桃果实成熟过程中的表达

前期数据表明, 溶质型桃(‘黄金蜜 3 号’和‘中油桃 13 号’)随着果实的成熟, 生长素含量和乙烯释放量迅速增加, 果实硬度迅速下降; 而硬质型桃(‘Yumyeong’和‘中油桃 16 号’)生长素含量和乙烯释放量均处于极低的水平, 果实硬度也没有明显改变(Pan et al., 2015; Zeng et al., 2015)。

采用数字表达谱对溶质型桃‘黄金蜜 3 号’和硬质型桃‘Yumyeong’成熟期进行测序, 将其 Aux/IAA 家族基因的 reads 数 RPKM 均一化, 绘制热图见图 4。

同时将这些基因的 RPKM 值与乙烯合成限速酶(ACS1, ppa004774m)和生长素合成限速酶(YUCCA11, ppa008176m)基因的 RPKM 值进行聚类, 结果显示 ppa011821m、ppa011570m、ppa011935m、ppa018535m、

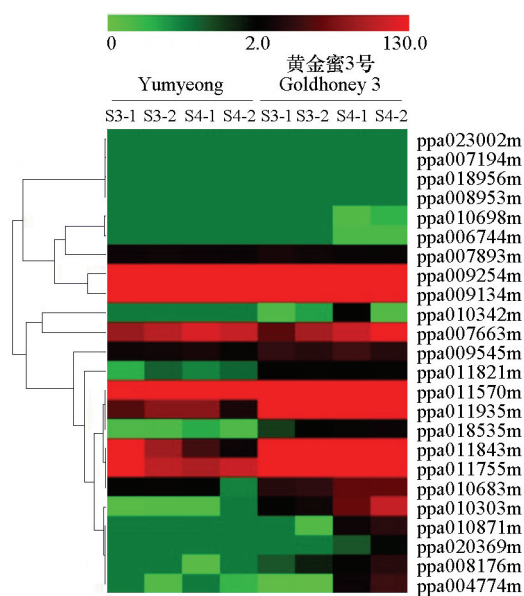


图4 AUX/IAA, ACS和 YUCCA11 在‘黄金蜜 3 号’和‘Yumyeong’桃果实各成熟阶段(S3-1、S3-2、S4-1 和 S4-2)的表达

Fig. 4 Expression of AUX/IAA, ACS and YUCCA11 genes in ‘Goldhoney 3’ and ‘Yumyeong’ peach fruits were sampled at the S3-1, S3-2, S4-1, and S4-2 stages

ppa011843m、*ppa011755m*、*ppa010683m*、*ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m* 这 10 个基因与 *ppa004774m*、*ppa008176m* 聚在一起，表明这些基因的表达具有相似性，它们在硬质型‘Yumyeong’桃的表达量均远低于溶质型‘黄金蜜 3 号’桃，且随着果实的成熟表达量迅速上升。

以溶质型桃‘黄金蜜 3 号’和硬质型桃‘Yumyeong’成熟期的果实为试材，采用 qPCR 分析这 10 个基因的表达特点，以‘黄金蜜 3 号’（溶质型）果实第 2 次膨大期（S3-1）各基因的表达量作为对照，结果与表达谱的结果一致，这 10 个基因在硬质型‘Yumyeong’桃的表达量均远低于溶质型‘黄金蜜 3 号’桃（图 5）。

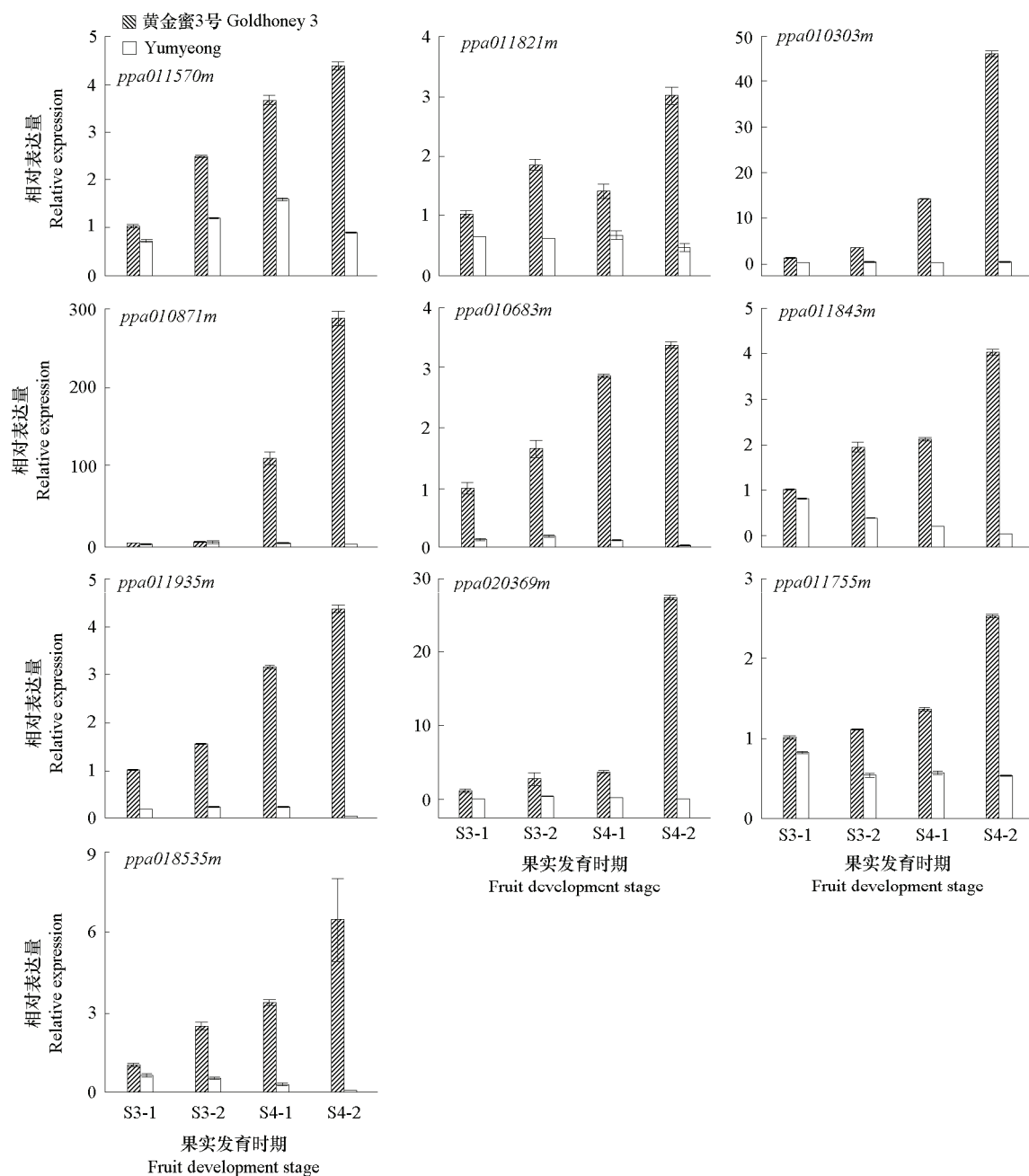


图 5 AUX/IAA 基因在‘黄金蜜 3 号’和‘Yumyeong’桃各果实发育期（S3-1、S3-2、S4-1 和 S4-2）的表达
Fig. 5 Expression profile of peach AUX/IAA gene family during fruit ripening of ‘Goldhoney 3’ and ‘Yumyeong’ peach fruits were sampled at the S3-1, S3-2, S4-1, and S4-2 stages

为了验证上述结果, 以另一对溶质型桃‘中油桃 13 号’和硬质型桃‘中油桃 16 号’不同成熟阶段的果实为试材进行分析, 结果 (图 6) 显示 10 个基因在溶质型桃‘中油桃 13 号’果实的表达量均远高于对应时期硬质型桃‘中油桃 16 号’; 其中 5 个基因 (*ppa011570m*、*ppa010303m*、*ppa010871m*、*ppa010683m* 和 *ppa020369m*) 随着果实成熟上调表达, 上调最明显的 3 个基因是 *ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m*, 这些基因的表达与‘黄金蜜 3 号’和‘Yumyeong’的表

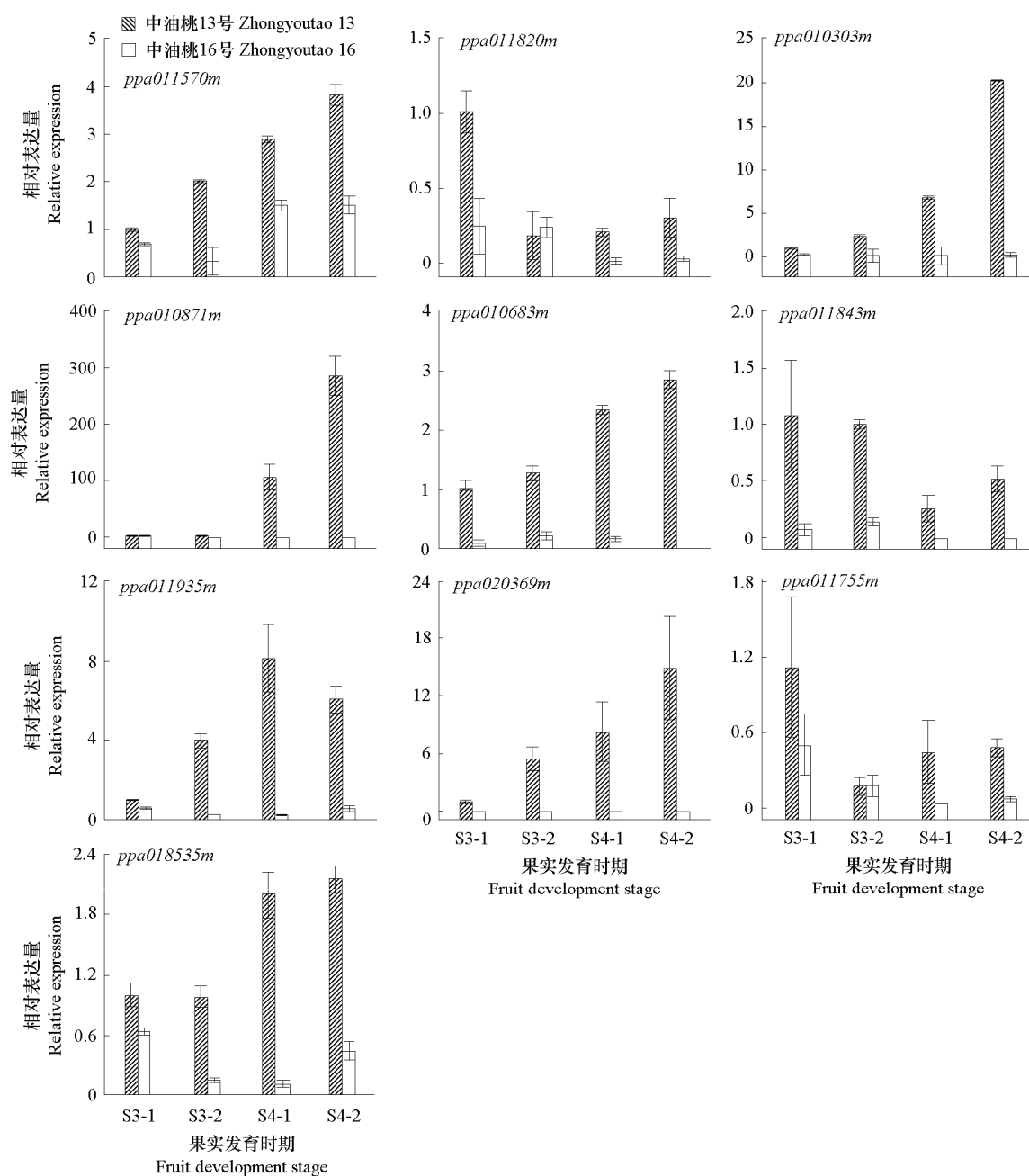


图 6 AUX/IAA 基因在‘中油桃 13 号’和‘中油桃 16 号’果实成熟过程中的表达

Fig. 6 Expression profile of *PpAUX/IAA* gene family during fruit ripening of ‘Zhongyoutao 13’ and ‘Zhongyoutao 16’ peaches

达非常类似, 与 *ppa004774m* 和 *ppa008176m* 的表达模式最为接近。除此之外, 与在 ‘Yumyeong’ 成熟中的表达一致, *ppa011821m*、*ppa018535m*、*ppa010683m*、*ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m* 这 6 个基因在 ‘中油桃 16 号’ 果实成熟中几乎没有表达。

因此, 通过 10 个桃 Aux/IAA 家族基因在两对溶质型桃和硬质型桃成熟期的表达发现, 它们在溶质型桃的表达均高于硬质型桃, 其中 *ppa010303m*、*ppa010871m* 和 *ppa020369m* 表现最为明显。

3 讨论

生长素/吲哚乙酸 (Aux/IAA) 基因编码核定位蛋白, 属于生长素原初响应基因。Aux/IAA 基因家族作为生长素信号转导通路的重要调节子, 通过对生长素介导的转录水平的调节, 参与植物生长发育的诸多过程。本研究中通过桃全基因组分析, 获得了 22 个桃的 AUX/IAA 家族基因。所有的 AUX/IAA 蛋白除 *ppa018956m* 缺失了结构域 I 外, 均包含 I、II、III 和 IV 结构域。进化分析表明桃 Aux/IAA 蛋白分为 A、B、C、D、E、F、G、I、J、K 共 10 组。染色体分布表明这 22 个基因集中分布在 5 条染色体, 这些数据证实了该家族基因在进化过程中的保守性 (Jain et al., 2006; Wang et al., 2010)。

前人的研究表明, 桃果实成熟过程中 Aux/IAA 和 TIR1 等生长素相关基因上调表达 (Trainotti et al., 2007)。最近一些研究通过比较溶质和硬质两种类型桃的果实发现, 果实成熟期生长素含量和乙烯释放量存在明显的差异, 同时伴随着控制乙烯合成关键限速酶基因 *ACS1* 和生长素合成限速酶基因 *YUCCA11* 的表达存在趋同的变化, 暗示生长素可能是桃果实成熟期乙烯释放的先决因素 (Pan et al., 2015; Zeng et al., 2015)。本研究中通过比较分析 Aux/IAA 基因家族在两对溶质型和硬质型果实成熟期的表达发现, 两者间有多达 10 个差异表达的 Aux/IAA 基因, 这些基因与 *ACS1*、*YUCCA11* 共表达, 暗示着这 10 个基因在桃果实成熟过程中受到生长素的诱导表达。有报道证明番茄 *SI-IAA3* 的表达受生长素和乙烯的诱导, 反义下调 *SI-IAA3* 会导致生长素和乙烯调控的性状变化, 包括改变顶端优势, 抑制生长素反应, 抑制茎的伸长和形成顶端弯钩 (Chaabouni et al., 2009)。而在拟南芥中, *AtIAA28* 的突变体 *iaa28-l* 表现出对生长素, 细胞分裂素和乙烯不敏感性 (Rogg et al., 2001), 表明 Aux/IAA 可能作为激素间直接关联的转录调节子, 参与植物体内激素的平衡。Aux/IAA 可能作为生长素信号途径的重要成分参与调控 *ACS1* 基因的表达, 又或者 *ACS1* 可能和 Aux/IAA 一致, 也是生长素的原初反应基因之一, 然而这些仅仅只能作为推测, 还有待证实。本研究中筛选得到的 5 个基因 (*ppa011570m*、*ppa010303m*、*ppa010871m*、*ppa010683m* 和 *ppa020369m*) 随着溶质型桃果实的成熟上调表达, 这些基因是否或者如何参与桃果实的成熟过程, 是冗余的还是分饰不同的功能, 尚有待进一步的证明。前人围绕 Aux/IAA 的研究更多是如何影响器官发育, 侧根形成等, 但围绕果实成熟的研究非常少。因此, 通过本研究获得的 Aux/IAA 基因将有助于研究桃果实成熟期生长素跃变的原因和成熟期跃变引起桃果实成熟的响应机制。

References

- Abel S, Theologis A. 1995. A polymorphic bipartite motif signals nuclear targeting of early auxin-inducible proteins related to PS-IAA4 from pea (*Pisum sativum*). *The Plant Journal*, 8 (1): 87 - 96.
- Bassa C, Mila I, Bouzayen M, Audran-Delalande C. 2012. Phenotypes associated with down-regulation of SI-IAA27 support functional diversity among Aux/IAA family members in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 53 (9): 1583 - 1595.
- Brandi F, Bar E, Mourgues F, Horváth G, Turcsi E, Giuliano G, Liverani A, Tartarini S, Lewinsohn E, Rosati C. 2011. Study of ‘Redhaven’

- peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*, 11 (1): 24.
- Chaabouni S, Jones B, Delalande C, Wang H, Li Z, Mila I, Frasse P, Latche A, Pech J C, Mondher Bouzayen M. 2009. SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1349 - 1362.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435 (7041): 441 - 445.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser D, Estelle M. 2001. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414 (6841): 271 - 276.
- Haji T, Yaegaki H, Yamaguchi M. 2001. Changes in ethylene production and flesh firmness of melting, non-melting and stony hard peaches after harvest. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70 (4): 458 - 459.
- Haji T, Yaegaki H, Yamaguchi M. 2003. Softening of stony hard peach by ethylene and the induction of endogenous ethylene by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72 (3): 212 - 217.
- Hardtke C S, Ckurshumova W, Vidaurre D P, Singh S A, Stamatou G, Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle H, Berleth T. 2004. Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development*, 131 (5): 1089 - 1100.
- Jain M, Kaur N, Garg R, Jitendra K, Akhilesh K T, Tyagi K P, Khurana J. 2006. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional and integrative genomics*, 6 (1): 47 - 59.
- Kim J, Harter K, Theologis A. 1997. Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (22): 11786 - 11791.
- Leyser O. 2002. Molecular genetics of auxin signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 53 (1): 377 - 398.
- Liscum E, Reed J W. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Auxin Molecular Biology*, 49 (3, 4): 387 - 400.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Mazzucato A, Cellini F, Bouzayen M, Zouine M, Mila I, Minoia S, Petrozza A, E. Picarella M, Ruii F, Carriero F. 2015. A TILLING allele of the tomato Aux/IAA9 gene offers new insights into fruit set mechanisms and perspectives for breeding seedless tomatoes. *Molecular Breeding*, 35 (1): 1 - 15.
- Mortazavi A, Williams B A, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5: 621 - 628.
- Pan L, Zeng W, Niu L, Lu Z, Liu H, Cui G, Zhu Y, Chu J, Li W, Fang W, Cai Z, Li G, Wang Z. 2015. *PpYUC11*, a strong candidate gene for the stony hard phenotype in peach (*Prunus persica* L. Batsch), participates in IAA biosynthesis during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 66 (22): 7031 - 7044.
- Pattison R J, Csukasi F, Catalá C. 2014. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiologia Plantarum*, 151 (1): 62 - 72.
- Quint M, Gray W M. 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (5): 448 - 453.
- Rogg L E, Lasswell J, Bartel B. 2001. A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *The Plant Cell*, 13 (3): 465 - 480.
- Su L, Audran C, Bouzayen M, Roustan J P, Chervin C. 2015. The Aux/IAA, SI-IAA17 regulates quality parameters over tomato fruit development. *Plant Signaling & Behavior*, 10 (11): e1071001.
- Su L, Bassa C, Audran C, Mila I, Cheniclet C, Chevalier C, Bouzayen M, Roustan J P, Chervin C. 2014. The auxin SI-IAA17 transcriptional repressor controls fruit size via the regulation of endoreduplication-related cell expansion. *Plant and Cell Physiology*, 55 (11): 1969 - 1976.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8): 1596 - 1599.
- Tatsuki M, Haji T, Yamaguchi M. 2006. The involvement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase isogene, *Pp-ACS1*, in peach fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 57 (6): 1281 - 1289.

- Tatsuki M, Nakajima N, Fujii H, Shimada T, Nakano M, Hayashi K I, Hayama H, Yoshioka H, Nakamura Y. 2013. Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch) . *Journal of Experimental Botany*, 64 (4): 1049 - 1059.
- Tiwari S B, Wang X J, Hagen G, Guilfoyle T J. 2001. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, 13 (12): 2809 - 2822.
- Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G. 2007. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany*, 58 (12): 3299 - 3308.
- Ulmasov T. 1997. Aux/IAA proteins repress repression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response element. *The Plant Cell*, 9 (11): 1963 - 1971.
- Verde I, Abbott A G, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori M T, Grimwood J, Cattonaro F, Zuccolo A, Rossini L, Jenkins J, Vendramin E, Meisel L A, Decroocq V, Sosinski B, Prochnik S, Mitros T, Policriti A, Cipriani G, Dondini L, Ficklin S, Goodstein D M, Xuan P, Del Fabbro C, Aramini V, Copetti D, Gonzalez S, Horner D S, Falchi R, Lucas S, Mica E, Maldonado J, Lazzari B, Bielenberg D, Pirona R, Miculan M, Barakat A, Testolin R, Stella A, Tartarini S, Tonutti P, Arús P, Orellana A, Wells C, Main D, Vizzotto G, Silva H, Salamini F, Schmutz J, Morgante M, Rokhsar D S. 2013. The high-quality draft genome of peach(*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, 45 (5): 487 - 494.
- Walker J C, Key J L. 1982. Isolation of cloned cDNAs to auxin responsive poly (A) + RNAs of elongating soybean hypocotyls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (23): 7185 - 7189.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech J C, Bouzayena M. 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant Cell*, 17 (10): 2676 - 2692.
- Wang Y, Deng D, Bian Y, Lv Y, Xie Q. 2010. Genome-wide analysis of primary auxin-responsive Aux/IAA gene family in maize (*Zea mays* L.) . *Molecular Biology Reports*, 37 (8): 3991 - 4001.
- Wu Min, Chen Kun-song, Jia Hui-juan, Xu Chang-jie, Zhang Shang-long. 2003. Changes in endogenous abscisic acid, indole-3-acetic acid and ethylene during postharvest ripening period of peach fruit. *Journal of Fruit Science*, 20 (3): 157 - 160. (in Chinese)
- 吴 敏, 陈昆松, 贾惠娟, 徐昌杰, 张上隆. 2003. 桃果实采后软化过程中内源 IAA、ABA 和乙烯的变化. *果树学报*, 20 (3): 157 - 160.
- Zeng W F, Pan L, Liu H, Niu L, Lu Z H, Cui G C, Wang Z Q. 2015. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) genes during nectarine fruit development and ripening. *Tree Genetics and Genomes*, 11 (2): 1 - 10.
- Zeng Wen-fang, Pan Lei, Liu Hui, Niu Liang, Lu Zhen-huang, Cui Guo-chao, Wang Zhi-qiang. 2015. Effect of NAA on fruit softening and ethylene biosynthesis of '24-30' nectarine. *Journal of Fruit Science*, 32 (2): 1017 - 1023. (in Chinese)
- 曾文芳, 潘 磊, 刘 慧, 牛 良, 鲁振华, 崔国朝, 王志强. 2015. 生长素对油桃 '24-30' 果实软化和乙烯生物合成的影响. *果树学报*, 32 (2): 1017 - 1023.