

桃 FLA 家族基因的生物信息学及表达分析

卞 坤^{1,2}, 邵佳蓉², 徐利伟², 沈子明^{1,2}, 陈 伟², 杨震峰^{2,*}

(¹上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

摘 要: 从桃基因组数据库筛选出了 12 个假定的成束状阿拉伯半乳糖蛋白 (FLA) 基因序列。对其蛋白结构进行分析, 结果显示 PpFLA7 不具有特定的阿拉伯糖或半乳糖糖基化位点, 不属于典型的 FLA 家族。PpFLA6 的氨基酸组成和保守域的分布与其他成员相比差别较大。聚类分析结果表明 PpFLAs 家族可以分为 Clade I、Clade II 和 Clade III 3 类。利用荧光定量 PCR (qPCR) 对不同组织和成熟阶段果实中的 FLA 进行表达分析, 发现各个成员在不同时期的组织中差异化表达, 其中 *PpFLA4* 在果实成熟阶段显著上调表达, 暗示其可能在桃果实的成熟阶段扮演重要角色。

关键词: 桃; 果实; 成束域; 阿拉伯半乳糖蛋白; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S 662.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 04-0653-11

Bioinformatic and Expression Analysis of Fasciclin-like Arabinogalactan Proteins (FLAs) Gene Family in Peach

BIAN Kun^{1,2}, SHAO Jiarong², XU Liwei², SHEN Ziming^{1,2}, CHEN Wei², and YANG Zhenfeng^{2,*}

(¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ²College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: Twelve Fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLA) sequences were screened from the peach (*Prunus persica*) genome database. Protein structure analysis of the 12 FLAs revealed that PpFLA7 seems not the classical member of FLA family due to the absence of glycosylated sites. PpFLA6 showed a significant difference with other ones because of a distinctive composition and distribution of conserved domains. Phylogenetic analysis indicated that PpFLAs family could be classified into 3 groups: Clade I, Clade II, and Clade III. Expression analysis by qPCR manifest that 12 *PpFLAs* were differentially expressed in various tissues, and the highest expression of *PpFLA4* in firm-ripe peach fruit suggest that this member may play an important role in peach fruit during ripening.

Keywords: peach; fruit; fasciclin-like domain; arabinogalactan protein; bioinformatics; expression analysis

植物的细胞壁是一个非常复杂的交联网状结构。细胞壁中的蛋白虽然仅占初生壁不超过 10% 的干质量, 却是维持其物理及生理功能的重要组成部分 (Bacic et al., 1988)。细胞壁蛋白是一个大的蛋白家族 (Kaul et al., 2000), 包括酶类、伸展蛋白 (extensin) 和富含羟脯氨酸的糖蛋白 (Hyp-rich

收稿日期: 2016-10-25; 修回日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371866); 浙江省自然科学基金项目 (LQ15C200004); 浙江省重中之重学科学生创新项目 (1740002979)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yangzf@zswu.edu.cn)

glycoprotein, HRGPs)。阿拉伯半乳糖蛋白 (Arabinogalactan proteins, AGPs) 是一类异质性的糖蛋白, 属于富含羟脯氨酸糖蛋白, 此类蛋白被高度糖基化并大量存在于植物细胞壁和细胞膜中 (Showalter, 2001)。AGP 的结构由一个被 II 型阿拉伯半乳糖氧糖基化的核心蛋白骨架支撑, 根据此核心蛋白序列可将 AGPs 分为 7 个亚类 (Gaspar et al., 2001; Showalter et al., 2010)。

成束状阿拉伯半乳糖蛋白 (Fasciclin-like arabinogalactan protein, FLA) 是 AGPs 蛋白家族中的一员, 可能参与植物的生长发育和对环境条件的适应等。有研究表明, 拟南芥盐过敏感型突变体 *sos5* 的 FLA4 在第 2 个成束域上发生了定点突变, 导致植株细胞壁变薄, 根尖细胞的细胞壁膨大, 并且增加了对盐胁迫的敏感性 (Shi et al., 2003); *AtFLA11* (拟南芥)、*PtFLA11* (杨树) 和 *ZeFLA11* (百日菊) 均参与了细胞次生壁的形成 (Lafarguette et al., 2004; Brown et al., 2005; Ito et al., 2005; Persson et al., 2005; Dahiya et al., 2006), 且 *GhFLA1* 会影响棉花细胞的延伸及次生细胞壁发育时期的胞间交流 (Liu et al., 2008)。对拟南芥 *fla11/fla12* 双突变体的研究表明, *AtFLA11* 和 *AtFLA12* 可能影响植物茎的力度和弹性 (MacMillan et al., 2010); 拟南芥 *fla1* 突变体在芽的再生阶段具有表型缺陷, 表明 *fla1* 可能参与组织培养中芽的发育 (Johnson et al., 2011)。番茄基因组协会对番茄果实中鉴定的 5 个 FLA 基因进行了研究, 发现其转录丰度在果实成熟启动之前大幅下降, 这表明 FLA 成员可能在果实的成熟软化过程中扮演着重要的角色 (Tomato Genome Consortium, 2012)。

桃 (*Prunus persica*) 是典型的呼吸跃变型果实, 成熟时正值夏季高温多雨季节, 采后呼吸代谢旺盛, 常温下果实会迅速软化, 易受病原菌侵染而引起大量腐烂 (陈克明 等, 2013)。但桃果实又属于冷敏果实, 在低温下贮藏极易发生冷害, 其症状表现为果心褐变、果肉粉质化或糠化、果汁减少, 严重影响食用品质和商品价值 (Nilo et al., 2010; 宋春波 等, 2015)。以往对于影响果实成熟软化和低温冷害发生相关蛋白的研究主要集中于细胞壁降解蛋白和伸展蛋白 (Hayama et al., 2003), 而 FLA 作为一种具有细胞粘合作用的糖蛋白, 是否能够调控细胞壁的代谢活动, 进而影响果实的成熟软化进程尚未见报道。本研究中以 ‘湖景蜜露’ 桃果实作为研究对象, 采用生物信息学方法对从桃基因组数据库筛选出的 12 个假定 FLA 序列进行分析, 为揭示 FLA 在桃果实成熟软化和低温冷害发生过程中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

‘湖景蜜露’ 桃组织和不同发育阶段果实均取自浙江省宁波市奉化市水蜜桃研究所。分别采集花苞 (2015 年 3 月 14 日)、花 (2015 年 3 月 24 日)、叶芽 (2015 年 4 月 3 日)、软核 I 期果实 (花后 35 d)、软核 II 期果实 (花后 45 d)、硬核期果实 (花后 55 d) 和硬熟果实 (花后 85 d) 进行分析 (Gabotti et al., 2015)。果实样品均采自树体外围中部, 每种果实采集 5 个, 重复 3 次。样品采后立即用液氮冷冻, -80°C 保存备用。

采用改进的植物总 RNA 提取试剂盒 (Omega) 提取不同组织和各发育阶段果实的总 RNA。加入无 RNase 活性的 DNase I (Omega) 去除剩余的基因组 DNA, 用 NanoDrop2000 核酸蛋白仪 (Thermo) 检测总 RNA 的浓度, 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的完整性。以总 RNA 为模板, 采用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒 (CWBIO) 合成 cDNA。

1.2 PpFLA 家族基因及蛋白结构特性分析

FLA 基因组序列、编码区序列、染色体上的分布位置等信息直接从 Phytozome 数据库 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 获得, 运用 ClustalW2 和 GeneDoc 软件进行 PpFLAs 家族成员之间的相似度计算; 利用在线工具 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析蛋白质基本性质; 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 GPI Lipid Anchor Project (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) 预测信号肽及 GPI 锚定位点; 采用 SubLoc v1.0 (http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm) 进行亚细胞定位; 利用 NCBI 提供的 Web CD-Search Tool 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 搜索 FLA 蛋白的保守域 (FAS domain), 并由 ClustalW2 软件完成多序列比对分析; 用 Python (3.5) 程序寻找蛋白的各类糖基化区域 (AG 域); 使用 MEGA 5.10 软件邻接法 (Neighbor-joining) 绘制系统进化树, 自展值 (Bootstrap 值) 设置为 500。

1.3 实时荧光定量 PCR 分析

用 Beacon Designer 7 软件设计 PpFLA 家族基因特异性引物序列 (表 1), 采用 SYBR Green 荧光染料法进行荧光定量 PCR 反应, 操作步骤参照 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR 试剂盒 (Thermo) 的说明书进行。qPCR 程序设置: 95 °C 初始变性 7 min, 95 °C 保持 15 s, 进行 39 个循环, 45 ~ 60 °C 退火 30 s, 75 °C 保持 15 s。每种样品重复 3 次, 以 *PpTEF2* 作为内参基因 (Tong et al., 2009), 并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达水平。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers sequences used for qPCR

基因 Gene	GDR 登录号 Accession No.	引物序列 (5' - 3') Forward and reverse primer sequence	扩增长度/bp Amplicon size	退火温度/°C Annealing temperature
<i>PpFLA1</i>	ppa023463m	F: GAATGTGAGGCTCCAATC; R: CAGTGGGTAGTATGAATGG	82	52
<i>PpFLA2</i>	ppa022851m	F: AGGTGGCTTCAATGTCTT; R: AACGGTGAGTTGGCTATT	97	49
<i>PpFLA4</i>	ppa026177m	F: AGGTGGCTTCAATGTCTTA; R: AACGGTGAGTTGGCTATT	97	47
<i>PpFLA5</i>	ppa024648m	F: TCTTGTCACACCTCCATT; R: GAGCACACTGTCAACTTG	76	51
<i>PpFLA6</i>	ppa023379m	F: GTTAAGGTTGCTGCTAAG; R: ACAAGTAGAGAAGTGAGAAT	96	48
<i>PpFLA8</i>	ppa005721m	F: CATTCCACACCTTCCTTA; R: ATAGTTATGCCTTCCTCAG	91	50
<i>PpFLA9</i>	ppa007675m	F: CTGCTGAGTCGGAGAACA; R: GGACAAGACAACGGAGGA	119	57
<i>PpFLA10</i>	ppa010321m	F: CACTCTGAAGACGAAGAT; R: TGTCAATGGTGTAATAGC	83	49
<i>PpFLA11</i>	ppa006158m	F: TGGAGACACAGATCAACA; R: ACAAGTCATTAGGCAACAG	87	50
<i>PpFLA12</i>	ppa006726m	F: CTTCTCCACTCAGCCACAG; R: GACCAGCCTTCTCAAGAATAGC	95	50
<i>PpTEF2</i>	ppa022313m	F: GGTGTGACGATGAAGAGTGATG; R: TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG	129	59

2 结果与分析

2.1 PpFLA 家族基因及蛋白结构特性分析

从 Phytozome 数据库中得到 12 个假设的 FLA 编码区序列 (表 2)。12 个 PpFLA 家族成员分别分布在桃基因组的 5 条染色体上, 其中第 6 号染色体上有 6 个; 除 PpFLA6 含有 2 个 FAS 保守域外, 其他成员均含有 1 个 FAS 保守域; 同源性分析结果表明, PpFLA 家族成员均与梅 (*Prunus mume*) PmFLA 的同源性最高。氨基酸相似度分析表明: PpFLA2 与 PpFLA4 的相似度最高, 达到 83%; PpFLA4 与 PpFLA5 的相似度达到 80%; 其余成员之间的相似程度较低, 而 PpFLA6 和 PpFLA8 的相似度仅有 3% (表 3)。

表 2 桃 FLA 家族相关信息
Table 2 Information regarding FLA family genes in peach

基因 Gene	JGI 登录号 JGI-locus	染色体定位 Chromosome No.	FAS 域数 Number of FAS domain	FAS 域分布 Location of FAS domain	最高同源性物种 Highest homolog	登录号 Accession No.
<i>PpFLA1</i>	ppa023463m	6: 5305129..5306208	1	205 ~ 341	<i>Prunus mume</i>	XP_008223499.1
<i>PpFLA2</i>	ppa022851m	6: 6870334..6871230	1	93 ~ 226	<i>P. mume</i>	XP_008225430.1
<i>PpFLA3</i>	ppa026177m	6: 6872740..6873911	1	77 ~ 210	<i>P. mume</i>	XP_008225421.1
<i>PpFLA4</i>	ppa024648m	6: 6890515..6891390	1	90 ~ 223	<i>P. mume</i>	XP_008225441.1
<i>PpFLA5</i>	ppa023379m	6: 6899754..6900584	1	77 ~ 210	<i>P. mume</i>	XP_008225462.1
<i>PpFLA6</i>	ppa005721m	7: 12806403..12809812	2	37 ~ 172, 295 ~ 399	<i>P. mume</i>	XP_008241098.1
<i>PpFLA7</i>	ppa007675m	3: 15418733..15420402	1	226 ~ 329	<i>P. mume</i>	XP_008229928.1
<i>PpFLA8</i>	ppa010321m	3: 15945162..15946867	1	50 ~ 183	<i>P. mume</i>	XP_008229843.1
<i>PpFLA9</i>	ppa006158m	2: 16807728..16809005	1	195 ~ 326	<i>P. mume</i>	XP_008232692.1
<i>PpFLA10</i>	ppa006726m	4: 18113925..18115189	1	225 ~ 329	<i>P. mume</i>	XP_008227156.1
<i>PpFLA11</i>	ppa022313m	7: 21167588..21168409	1	47 ~ 182	<i>P. mume</i>	XP_008242761.1
<i>PpFLA12</i>	ppa023999m	6: 21947112..21947849	1	45 ~ 180	<i>P. mume</i>	XP_008243923.1

表 3 PpFLA 蛋白家族氨基酸相似度百分比
Table 3 Percentage of identities among PpFLA proteins in peach %

蛋白 Protein	PpFLA2	PpFLA3	PpFLA4	PpFLA5	PpFLA6	PpFLA7	PpFLA8	PpFLA9	PpFLA10	PpFLA11	PpFLA12
PpFLA1	13	14	13	14	5	21	13	23	22	11	13
PpFLA2		64	83	77	7	13	22	15	15	28	34
PpFLA3			67	66	5	12	22	14	14	35	36
PpFLA4				80	7	13	22	15	16	30	35
PpFLA5					7	12	24	16	14	32	38
PpFLA6						4	3	6	5	6	5
PpFLA7							11	34	57	12	11
PpFLA8								14	13	30	23
PpFLA9									37	14	13
PpFLA10										13	13
PpFLA11											38

PpFLAs 各蛋白序列的长度在 245 ~ 447 bp 之间, pI 5.05 ~ 8.67, 相对分子质量 25.40 ~ 49.83 kD。亲水性平均系数 (GRAVY) 表明, 除 PpFLA3、PpFLA6 和 PpFLA11 为亲水性蛋白外, 其余家族成员均为疏水性蛋白。除 PpFLA6 外, 其余成员均含有 1 个信号肽, 但仅 PpFLA7 拥有一个 GPI 锚定区。亚细胞定位预测结果表明, 7 个蛋白定位于细胞外基质, 4 个蛋白定位于细胞核中, 而 PpFLA6 则定位于线粒体上 (表 4)。

表 4 桃 FLA 蛋白家族的特征
Table 4 The characteristics of FLA proteins in peach

蛋白 Protein	氨基酸长度/aa Amino acid length	分子量/kD Molecular weight	等电点 pI	亲水性平 均系数 GRAVY	信号肽 Signal peptide	信号肽位点 Most likely cleavage site	GPI 锚定位点 GPI-modification site	亚细胞定位 Subcellular localization
PpFLA1	360	38.38	6.06	0.294	1	27 ~ 28		细胞外 Extracellular
PpFLA2	298	30.82	7.78	0.151	1	27 ~ 28		细胞核 Nuclear
PpFLA3	276	29.16	5.66	- 0.237	1	26 ~ 27		细胞核 Nuclear
PpFLA4	291	30.23	8.48	0.122	1	23 ~ 24		细胞外 Extracellular
PpFLA5	276	28.60	7.78	0.111	1	19 ~ 20		细胞核 Nuclear
PpFLA6	447	49.83	7.37	- 0.413	0			线粒体 Mitochondria
PpFLA7	359	38.35	6.50	0.186	1	27 ~ 28	341	细胞外 Extracellular
PpFLA8	254	26.81	5.05	0.135	1	19 ~ 20		细胞外 Extracellular
PpFLA9	425	43.62	5.47	0.225	1	23 ~ 24		细胞外 Extracellular
PpFLA10	398	42.21	6.30	0.043	1	25 ~ 26		细胞外 Extracellular
PpFLA11	249	25.96	8.67	- 0.011	1	25 ~ 26		细胞核 Nuclear
PpFLA12	245	25.40	6.16	0.264	1	23 ~ 24		细胞外 Extracellular

2.2 PpFLAs 糖基化特性分析

FLAs 是高度糖基化的一类蛋白, 因其富含 Pro 或 Hyp 而极易被阿拉伯糖和半乳糖修饰。由于 FLA 家族成员众多, 手动寻找蛋白糖基化修饰区域甚为繁琐, 因而根据前人提出的“Hyp 连续性假说”(Schultz et al., 2002), 利用 Python 语言编写了一段简单的程序用于辅助研究 FLA 蛋白的糖基化特性。基于“Hyp 连续性假说”, 含有[Ala/Ser/Thr]-Hyp-X (0,10) -[Ala/Ser/Thr]-Hyp 的区域易被半乳糖糖基化, 含有[Ala/Ser/Thr]-Hyp-Hyp 或[Ala/Ser/Thr]-Hyp-Hyp-Hyp 的区域会被阿拉伯多糖链修饰。这 3 类糖基化域的核心表达式分别为: [AST]P(?:{0,10}[AST]P)+; [AST]PP; [AST]PPP, 位置分布信息可用“x.group (), x.span ()”功能实现。统计结果(表 5)表明, 除 PpFLA7 外, 其余成员均具有 1~3 段 AGP 域。

表 5 PpFLA 蛋白家族糖基化模型数量
Table 5 Number of putative glycomodules of the putative PpFLA proteins

蛋白 Protein	糖基化域数量 Number of putative glycomodules			AGP 域分布 Location of AGP-like region
	[Ala/Ser/Thr]-Hyp-X (0,10) -[Ala/Ser/Thr]-Hyp	[AST]-P-P	[AST]-P-P-P	
PpFLA1	2	0	0	146~153, 352~358
PpFLA2	2	2	0	29~81, 231~244
PpFLA3	3	2	0	28~64, 215~230, 251~262
PpFLA4	2	1	0	30~77, 228~241
PpFLA5	2	1	0	26~62, 215~228
PpFLA6	1	1	0	211~240
PpFLA7	0	0	0	—
PpFLA8	2	0	0	24~38, 194~226
PpFLA9	3	1	0	168~182, 260~272, 333~386
PpFLA10	1	0	0	337~362
PpFLA11	2	0	1	20~32, 190~202
PpFLA12	2	0	0	25~33, 188~217

2.3 PpFLAs 成束域分析

经过 ClustalX2 的多序列比对, 找到 3 个特征性的保守域, 分别为 H1、[YF]H 和 H2(图 1, A)。H1 具有高度保守的 Thr, H2 具有类似于 Val、Leu 和 Ile 的疏水性氨基酸, [YF]H 基序分布于 H1 与 H2 之间(Showalter et al., 2010)。

由于 PpFLA6 的氨基酸组成与其他 PpFLA 成员差异较大, 与家族内成员比对时无法确定其保守域, 因此将其与其亲缘性相近的拟南芥 AtFLA15、AtFLA16、AtFLA17 和 AtFLA18 进行比对(图 1, B), 发现其同样含有这 3 个高度保守的结构域。

基于蛋白结构简图(图 2)并根据保守序列的分布情况可将所有成员分为 3 类, PpFLA1、PpFLA7、PpFLA9 和 PpFLA10 归为一类, PpFLA6 自成一类, 其余归为另一类。

2.4 PpFLAs 聚类分析

为了研究 PpFLA 家族成员的进化关系, 基于各成员的氨基酸组成构建了系统进化树, 并挑选了拟南芥 21 个 AtFLA 家族成员作为参照。聚类结果显示, PpFLA2、PpFLA3、PpFLA4、PpFLA5、PpFLA8、PpFLA11 和 PpFLA12 聚为 Clade I, PpFLA1、PpFLA7、PpFLA9 和 PpFLA10 聚为 Clade II, PpFLA6 为 CladeIII(图 3)。Johnson 等(2003)将拟南芥的 FLA 成员分为 4 组, 本研究的分类结果与之略有差别, 本研究中将 PpFLA6 与拟南芥 C 组及 D 组成员中的 AtFLA19、AtFLA20、AtFLA21 划为了一类。

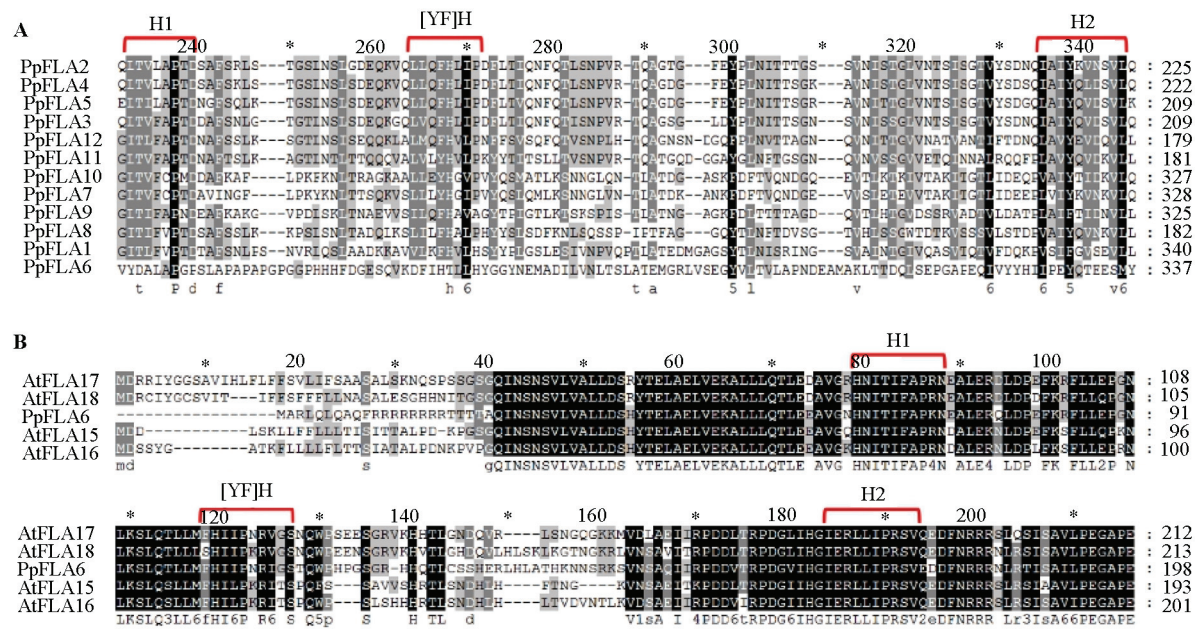


图 1 桃 (Pp) 和拟南芥 (At) FLA 蛋白成束区域序列比对结果

Fig. 1 Alignment of multiple sequences encoding the fasciclin-like domains of PpFLAs and AtFLAs

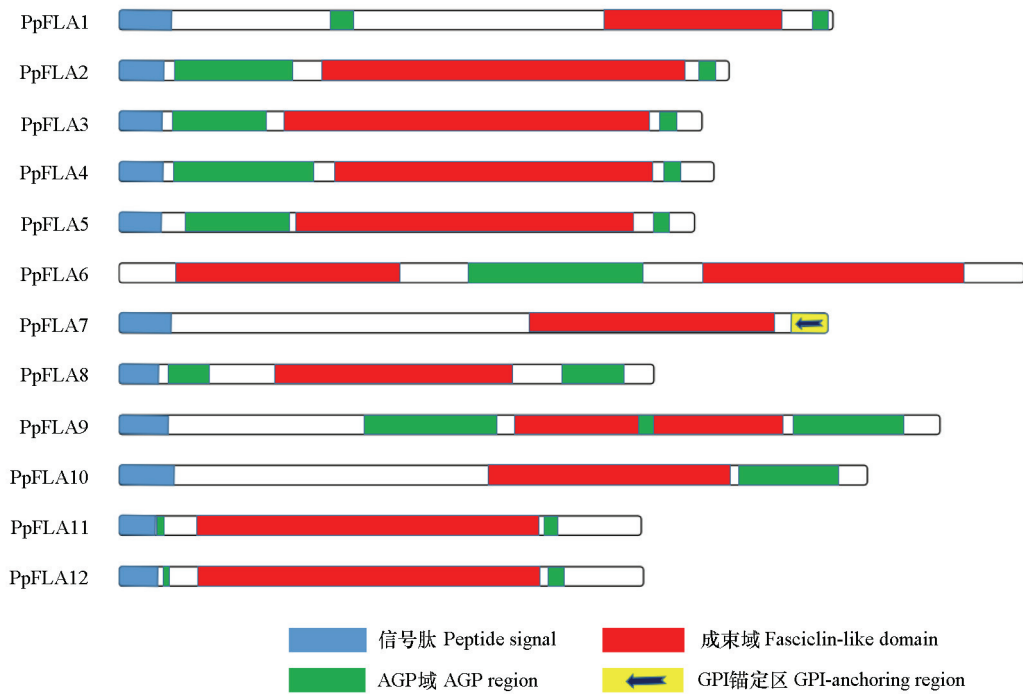


图 2 桃 FLA 蛋白结构简图

Fig. 2 Schematic representation of FLAs in peach

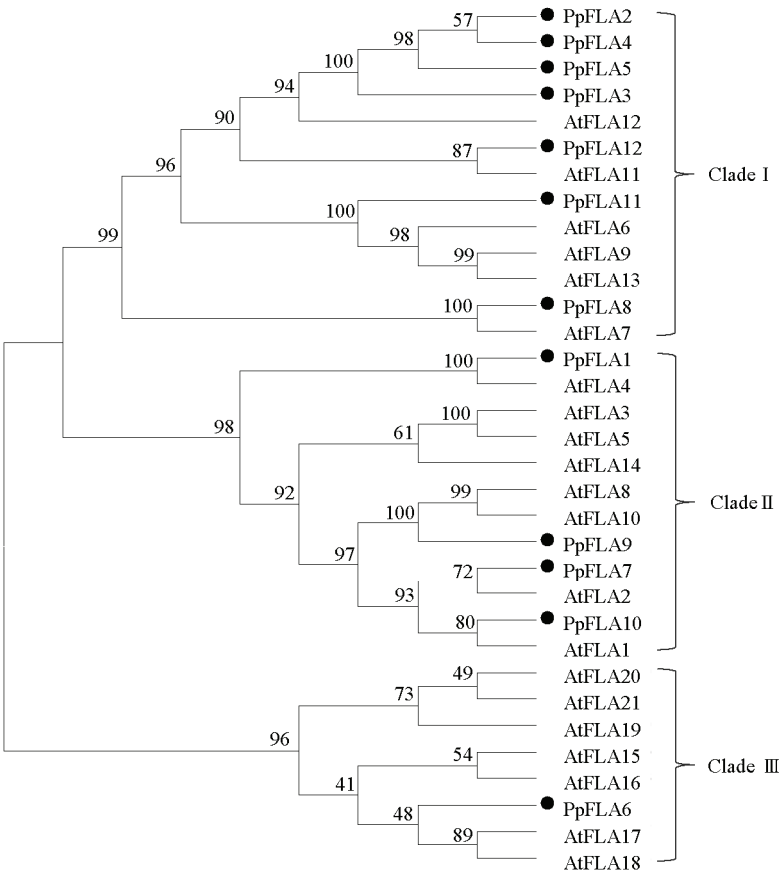


图 3 桃 (Pp) 和拟南芥 (At) FLA 蛋白的系统进化树
每个节点上的数字代表自展值。

Fig. 3 Phylogenetic relationships of FLAs in *Prunus persica* (Pp) and *Arabidopsis thaliana* (At)
The bootstrap value showed with the number on each node.

2.5 PpFLA 表达分析

由于前期 RT-PCR 未检测到 *PpFLA3* 和 *PpFLA7* 的表达, 本研究分析了除其之外的 10 个 *PpFLA* 在不同生长发育时期的相对表达水平 (图 4)。 *PpFLA1* 和 *PpFLA9* 在花苞、花和叶芽中均有表达, 而在果实中的表达则随着成熟进程而逐渐下降。 *PpFLA2* 在叶芽中的表达水平最高, 而在果实的成熟过程中变化不明显。 *PpFLA4* 在花苞、花和叶芽中均有表达, 但果实硬熟时明显上调, 表达量高于叶芽和其他发育阶段。 *PpFLA5* 和 *PpFLA12* 的表达相似, 在花苞、花和叶芽中表达量较低, 但在软核 II 期果中出现特异性表达。 *PpFLA6* 在花苞和花中的表达量高于叶芽, 且软核 II 期果中的表达量在果实发育阶段最高。 *PpFLA8* 和 *PpFLA10* 分别在花和花苞中的表达最高, 而在果实成熟过程中变化不明显。 *PpFLA11* 在花苞和花中表达均高于叶芽, 而在软核 II 期和硬核期果实中几乎无表达, 但在硬熟期果实中又出现明显的上调表达。

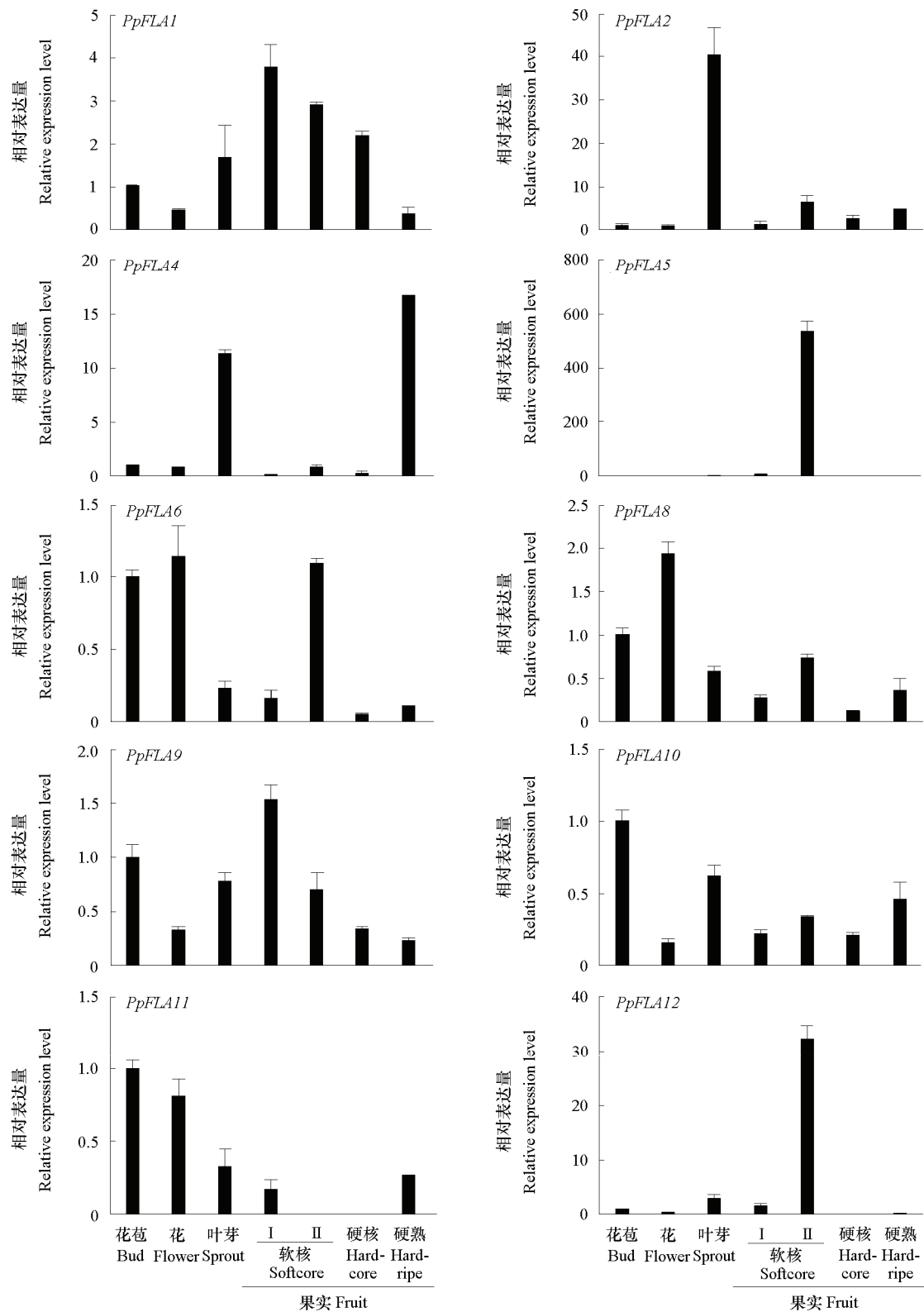


图 4 *PpFLA* 家族基因在桃不同生长发育阶段的相对表达情况
Fig. 4 Relative expression profile of *PpFLA* genes at different developmental stages in peach

3 讨论

作为一种高度糖基化的蛋白,阿拉伯半乳聚糖蛋白(AGPs)几乎存在于所有的水生和陆生植物的组织和细胞中,成束状阿拉伯半乳糖蛋白(FLAs)是阿拉伯半乳糖蛋白家族中的亚族。前人在拟南芥中鉴定出 21 个编码 FLA 的基因,并且把它们分为 4 组 (Johnson et al., 2003),随后又有研究分别从小麦和水稻中鉴定得到了 34 和 24 个 FLAs (Faik et al., 2006)。从大白菜中鉴定得到的 17 个 FLAs 均含有 H1 和 H2 保守域,其中 5 个 FLA 被 GPI 锚定于细胞质膜,而且 *BrFLA6/9/22* 可能与拟南芥中的 *AtFLA11/12* 具有相同的作用,均能促进次生细胞壁的木质化 (Li & Wu, 2012)。本研究结果表明, *PpFLAs* 含有与拟南芥等物种 FLAs 相同的保守域,可能具有类似的生理功能。*PpFLAs* 家族中各成员之间的氨基酸组成差异较大,尤其是 *PpFLA6*, 具有独特的保守域分布且与其他成员的亲缘性较远,因此可以推测其可能是由不同于其他成员的另一条原始序列遗传变异而来。此外, *PpFLA7* 不含有 AGP 特征性的糖基化位点,因而不属于典型的 AGP,但其 C 端被 GPI 锚定,因此它有可能不直接参与细胞壁的结构组成,而是作为细胞质膜的嵌合蛋白在细胞延伸过程中维持细胞质膜的结构稳定 (Li et al., 2010)。

为了进一步明确 *PpFLAs* 的表达特性,测定了其家族成员在桃果实成熟过程中的表达变化。结果表明, Clade I 类中的 *PpFLA5* 和 *PpFLA12* 只在软核 II 期桃果实中特异表达。有研究发现, *ZeFLA11* 和 *PopFLAs* 仅在木质部表达,从而参与次生壁的积累,进而促使网状厚壁的形成 (Lafarguette et al., 2004; Dahiya et al., 2006)。软核 II 期是桃软核果向硬核果转变的时期,因此推测 *PpFLA5* 和 *PpFLA12* 可能具有与 *ZeFLA11* 和 *PopFLAs* 类似的作用。*PpFLA8* 在花中呈现最高的表达水平,这与拟南芥中 *AtFLA3* 的表达相似 (Li et al., 2010),说明它可能拥有与 *AtFLA3* 相似的功能,能够参与花粉管内壁的形成。

果实成熟过程中,细胞壁的结构和组成会发生显著的变化,在相关酶的作用下细胞壁多糖的降解和细胞壁结构的分离是果实软化的主要原因 (Dumville & Fry, 2003)。在番茄果实成熟过程中,细胞壁 P-C-H 网络结构发生分解,从而改变果胶与细胞壁之间的粘连 (Orfila et al., 2002)。FLA 因其拥有成束域而具有细胞粘合作用,因而可能在细胞壁交联过程中起到类似于塑化剂的功能。桃果实软化过程中,果胶主链断裂,果胶、半纤维素、纤维素多糖中的支链阿拉伯糖、半乳糖会发生不同程度的解离,可能是导致果实软化的重要原因 (Jin et al., 2006)。FLA 蛋白表面被阿拉伯半乳糖高度糖基化,很有可能涉及细胞壁多糖结构的变化,进而影响多糖降解的某些特性。发生冷害的桃果实细胞壁组分与正常果实相比具有很大差异,冷害果中含有较多的共价结合果胶质和离子结合果胶质,水溶性果胶质较少,果汁黏度也明显偏高 (茅林春和张上隆, 2001)。Clade II 类中, *PpFLA1* 和 *PpFLA9* 都在软核 I 期桃果实中达到表达高峰,因此它们可能参与初期桃果实肉质纤维的生长,这与棉花中 *GhFLA1* 和 *GbFLA5* 的作用类似 (Huang et al., 2013; Liu et al., 2013)。*PpFLA4* 在硬熟期极明显上调表达,表明它可能参与果实成熟软化的进程,但其作用方式和调控机制还有待进一步研究。

References

- Bacic A, Harris P J, Stone B A. 1988. Structure and function of plant cell walls. *The Biochemistry of Plants*, 14: 297 - 371.
- Brown D M, Zeef L A H, Ellis J, Goodacre R, Turner S R. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The Plant Cell*, 17 (8): 2281 - 2295.

- Chen Ke-ming, Chen Wei, Yang Zhen-feng. 2013. The relationship between the changes in soluble sugars and pectins contents and chilling injury of postharvest peach fruit. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 27 (5): 647 – 652. (in Chinese)
- 陈克明, 陈伟, 杨震峰. 2013. 桃果实采后可溶性糖和果胶类物质的变化与低温冷害的关系. *核农学报*, 27 (5): 647 – 652.
- Dahiya P, Findlay K, Roberts K, McCann M C. 2006. A fasciclin-domain containing gene, *ZeFLA11*, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv. Envy. *Planta*, 223 (6): 1281 – 1291.
- Dumville J C, Fry S C. 2003. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta*, 217 (6): 951 – 961.
- Faik A, Abouzouhair J, Sarhan F. 2006. Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. *Molecular Genetics and Genomics*, 276 (5): 478 – 494.
- Gabotti D, Negrini N, Morgutti S, Nocito N, Morgutti S, Nocito F F, Cocucci M. 2015. Cinnamyl alcohol dehydrogenases in the mesocarp of ripening fruit of *Prunus persica* genotypes with different flesh characteristics: changes in activity and protein and transcript levels. *Physiologia Plantarum*, 154 (2): 329 – 348.
- Gaspar Y, Johnson K L, McKenna J A, Bacic A, Schultz C J. 2001. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, 47 (1 – 2): 161 – 176.
- Hayama H, Ito A, Moriguchi T, Kashimura Y. 2003. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. *Postharvest Biology and Technology*, 29 (1): 1 – 10.
- Huang G Q, Gong S Y, Xu W L, Li W, Li P, Zhang C J, Li D D, Zheng Y, Li F G, Li X B. 2013. A fasciclin-like arabinogalactan protein, GhFLA1, is involved in fiber initiation and elongation of cotton. *Plant Physiology*, 161 (3): 1278 – 1290.
- Ito S, Suzuki Y, Miyamoto K, Ueda J, Yamaguchi I. 2005. AtFLA11, a fasciclin-like arabinogalactan-protein, specifically localized in sclerenchyma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (10): 1963 – 1969.
- Jin C, Suo B, Kan J, Wang H, Wang Z. 2006. Changes in cell wall polysaccharide of harvested peach fruit during storage. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (6): 657.
- Johnson K L, Jones B J, Bacic A, Schultz C J. 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, 133 (4): 1911 – 1925.
- Johnson K L, Kibble N A, Bacic A, Schultz C J. 2011. A fasciclin-like arabinogalactan protein (FLA) mutant of *Arabidopsis thaliana*, *fla1*, shows defects in shoot regeneration. *PLoS ONE*, 6 (9): e25154.
- Kaul S, Koo H, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon L J, Town C D. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408 (6814): 796 – 815.
- Lafarguette F, Leplé J C, Déjardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses M C, Pilate G. 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist*, 164 (1): 107 – 121.
- Li J, Wu X M. 2012. Genome-wide identification, classification and expression analysis of genes encoding putative fasciclin-like arabinogalactan proteins in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Molecular Biology Reports*, 39 (12): 10541 – 10555.
- Li J, Yu M, Geng L L, Zhao J. 2010. The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, *FLA3*, is involved in microspore development of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 64 (3): 482 – 497.
- Liu D, Tu L, Li Y, Wang L, Zhu L, Zhang X. 2008. Genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are specifically expressed during cotton fiber development. *Plant Molecular Biology Reporter*, 26 (2): 98 – 113.
- Liu H, Shi R, Wang X, Pan Y, Li Z, Yang X, Zhang G, Ma Z. 2013. Characterization and expression analysis of a fiber differentially expressed fasciclin-like arabinogalactan protein gene in Sea Island cotton fibers. *PLoS ONE*, 8 (7): e70185.
- MacMillan C P, Mansfield S D, Stachurski Z H, Evans R, Southerton S G. 2010. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal*, 62 (4): 689 – 703.
- Mao Lin-chun, Zhang Shang-long. 2001. Role of pectolytic enzymes and cellulase during ripening and woolly breakdown in peaches. *Acta*

- Horticulturae Sinica, 28 (2): 107 - 111. (in Chinese)
- 茅林春, 张上隆. 2001. 果胶酶和纤维素酶在桃果实成熟和絮败中的作用. 园艺学报, 28 (2): 107 - 111.
- Nilo R, Saffie C, Lilley K, Baeza-Yates R, Cambiazo V, Campos-Vargas R, González M, Meisel L A, Retamales J, Silva H, Orellana A. 2010. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). BMC Genomics, 11 (1): 43 - 62.
- Orfila C, Huisman M M, Willats W G, van Alebeek G J W, Schols H A, Seymour G B, Knox P J. 2002. Altered cell wall disassembly during ripening of *Cnr* tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. Planta, 215 (3): 440 - 447.
- Persson S, Wei H, Milne J, Page G P, Somerville C R. 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (24): 8633 - 8638.
- Schultz C J, Rumsewicz M P, Johnson K L, Jones B J, Gaspar Y M, Bacic A. 2002. Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. Plant Physiol, 129 (4): 1448 - 1463.
- Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu J K. 2003. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. The Plant Cell, 15 (1): 19 - 32.
- Showalter A M. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cellular and Molecular Life Sciences, 58 (10): 1399 - 1417.
- Showalter A M, Keppler B D, Lichtenberg J, Gu D, Welch L R. 2010. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. Plant Physiology, 153 (2): 485 - 513.
- Song Chun-bo, Chao Qing-qing, Liang Min-hua, Shao Jia-rong, Chen Wei, Yang Zhen-feng. 2015. Molecular cloning of *PpOAT* and *PpP5CS* and their expression profile in responses to exogenous GABA in postharvest peach fruit. Acta Horticulturae Sinica, 42 (11): 2133 - 2143. (in Chinese)
- 宋春波, 晁青青, 梁敏华, 邵佳蓉, 陈 伟, 杨震峰. 2015. 桃果实 *PpOAT* 和 *PpP5CS* 的克隆及其对外源 GABA 处理的响应表达. 园艺学报, 42 (11): 2133 - 2143.
- Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature, 485 (7400): 635 - 641.
- Tong Z G, Gao Z H, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. BMC Molecular Biology, 10 (1): 71.
- Zhao Z D, Tan L, Showalter A M, Lamport D T A, Kieliszewski M J. 2002. Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis. The Plant Journal, 31 (4): 431 - 444.