

Analysis of Tissue Specific Expression of *SOT* Gene Family in White Pear

Caiyun Yu, Chao Gu, Shaoling Zhang

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu
Email: slzhang@njau.edu.cn

Received: Aug. 20th, 2018; accepted: Sep. 6th, 2018; published: Sep. 14th, 2018

Abstract

The purpose of this paper is to identify sorbitol transporter (*SOT*) gene family members in white pear and the major *SOT* genes for sorbitol transport in pear tissues, using bioinformatics and the analysis of gene expression characteristic. Based on the sequenced results of whole genome from *Malus domestica*, *Fragaria vesca*, *Prunus mume*, *Prunus persica*, *Pyrus bretschneideri* and *Rubus occidentalis*, the gene sequences, gene structure, physical and chemical properties were analyzed by the method of bioinformation, the expression characteristics of *PbSOTs* gene in the various organs of white pear were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). In this study, a total of 62 *SOT* genes were identified from six Rosaceae species. *PbSOT11*, *PbSOT12*, *PbSOT14*, *PbSOT16*, *PbSOT23* and *PbSOT24* were almost not expressed in Chinese white pear tissues; *PbSOT5* was only expressed in flowers; *PbSOT4* was also almost not expressed in all tissues of Chinese white pear, and *PbSOT7/8* was only expressed in stem, flower and fruit; *PbSOT10* and *PbSOT13* were equally unexpressed in the white pear tissues, *PbSOT9* was only expressed in fruit; *PbSOT6* and *PbSOT20* were expressed in all tissues; *PbSOT1/2* was just expressed in root, stem, flower, and seed, and *PbSOT3* was expressed in roots, stems, flowers, leaves and fruits, but not in seeds, as well as *PbSOT19/21* and *PbSOT22*. *PbSOT20* is the main regulatory gene for sorbitol transportation from source to sink in all kinds of tissues in pear, while *PbSOT6* and *PbSOT19/21* are the possible regulatory genes for sorbitol transportation in root tissue.

Keywords

Pear, Rosaceae, Sorbitol Transporter, Tissue Expression Characteristics

白梨*SOT*基因家族成员组织表达特性的分析

余彩云, 谷超, 张绍铃

南京农业大学园艺学院, 江苏 南京
Email: slzhang@njau.edu.cn

收稿日期：2018年8月20日；录用日期：2018年9月6日；发布日期：2018年9月14日

摘要

本文旨在鉴定出白梨山梨醇转运蛋白(*SOT*)基因家族成员,利用生物信息学和基因组织表达特性的分析,明确梨各组织中参与山梨醇运输的主要*SOT*基因。基于全基因组测序结果,采用生物信息学方法鉴定出苹果、白梨、桃、梅、草莓和黑树莓6个蔷薇科果树物种*SOT*基因家族序列信息,并进行基因结构、理化特性等相关分析,并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术测定*PbSOTs*基因在白梨各个器官组织中的表达特性。从六个蔷薇科果树物种分离出*SOT*基因家族成员62个,其中,*PbSOT11*、*PbSOT12*、*PbSOT14*、*PbSOT16*、*PbSOT23*和*PbSOT24*在白梨各组织中几乎都不表达;*PbSOT5*仅在花中表达;*PbSOT4*在白梨各组织中基本也都不表达,*PbSOT7/8*仅在茎、花、果中表达;*PbSOT10*和*PbSOT13*在白梨各组织中同样都不表达,*PbSOT9*仅在果实中表达;*PbSOT6*和*PbSOT20*在所有组织中均表达;*PbSOT1/2*仅在根、茎、花和种子中表达,而*PbSOT3*和*PbSOT19/21*和*PbSOT22*在根、茎、花、叶和果实中都表达,但在种子中基本不表达。*PbSOT20*是梨山梨醇“源-库”迁移过程各组织的主要调控基因。而*PbSOT6*和*PbSOT19/21*是根组织中山梨醇转运主要调控基因。

关键词

梨, 蔷薇科果树, 山梨醇转运蛋白, 组织表达特性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖是影响果实品质和风味的重要因素,果实中糖主要包括蔗糖、果糖、葡萄糖和山梨醇。山梨醇是一种六碳糖醇,是蔷薇科果树的主要光合产物、运输物质以及储藏物质,在代谢和生长过程中起着重要的作用。作为主要运输物质,山梨醇在不同组织中的含量差异较大,在韧皮部的含量为65%~70% [1] [2],在成熟叶片细胞中的含量为30%~40% [3]。山梨醇的运输是一个主动运输过程,主要由山梨醇转运蛋白(*SOT*)协助完成[4]。目前,Gao等(2003, 2005)分别从苹果和酸樱桃中分离出两个与山梨醇有很高的亲和性的运输蛋白基因*PcSOT1*和*PcSOT2* [5] [6]。Watari等(2004)从苹果叶片分离出三个参与山梨醇运输的基因:*MdSOT3*、*MdSOT4*和*MdSOT5* [7]。此外,在苹果果实中还发现了定位在质膜上且与细胞色素b5间存在胞内互作的*MdSOT6*,该基因可调控细胞相应细胞内外山梨醇浓度的变化[8]。近年来,Zhang等(2014)和Wang等(2016)从鸭梨果实中分别克隆出*PbSOT1*和*PbSOT2* [2] [9]。戴美松等(2015)利用RNA-seq技术从砂梨果肉中鉴别出了22个可能表达的*SOT*基因家族成员[10]。然而,这些*SOT*基因在不同组织间表达水平的差异一直未得到关注。

梨是蔷薇科中重要的经济果树之一,近年来,随着白梨(*Pyrus bretschneideri*) [11]、苹果(*Malus domestica*) [12]、草莓(*Fragaria vesca*) [13]、梅(*Prunus mume*) [14]、桃(*Prunus persica*) [15]和黑树莓(*Rubus occidentalis*) [16]等相继完成全基因组测序,为从全基因组水平研究蔷薇科果树*SOT*提供了重要数据。本研究基于已公布的蔷薇科果树全基因组数据,筛选出梨、苹果、草莓、梅、桃和黑树莓等物种全部的*SOT*基因家族成员,通过生物信息学方法分析其基本理化性质、结构特征和进化关系,并通过荧光定量PCR

技术检测梨 *PbSOT* 家族成员在各个器官组织中的表达特性,为进一步分析其功能及梨山梨醇积累机制提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

供试材料梨品种为“砀山酥梨”,采自南京农业大学园艺教学与科研基地梨种质资源圃。试验于 2016 年至 2017 年进行,分别采集砀山酥梨的根,茎,叶,花,种子和果实为待测样品。样品采后即液氮速冻,并保存于 -80°C 冰箱备用。

2.2. 实验方法

2.2.1. 蔷薇科果树 *SOT* 基因的筛选与鉴定

SOT 基因序列信息分别从白梨基因组数据库(<http://peargenome.njau.edu.cn/>)、梅基因组数据库(<http://prunusmumegenome.bjfu.edu.cn>)、黑树莓基因序列信息从蔷薇科基因组数据库(GDR;<https://www.rosaceae.org/>)以及苹果、桃、草莓数据库(Phytozome;<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)获取。此外,从拟南芥基因组数据库(<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)获得拟南芥 *AtPLT1-6* 基因序列和苹果中已经报道[11]的 *MdSOT1* (AY237400)、*MdSOT2* (AY237401)、*MdSOT3* (AB125646)、*MdSOT4* (AB125647)和 *MdSOT5* (AB125648) 蛋白序列为模板在蔷薇科 6 个果树物种基因组数据库中进行 Blastp, 获得同源序列比对, 将获得的拟南芥蛋白序列和苹果 *MdSOTs* 序列分别与各物种同源序列利用软件 MEGA7.0 构建系统进化树, 与 *AtPLT*、*MdSOT* 亚家族聚为一类的为候选基因。通过 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)分析所有候选基因保守结构域, 移除与 *MdSOT* 家族基因保守结构域不一致的序列, 并在 NCBI 保守结构数据库 CCD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)中进一步验证保守结构域, 确定目的基因。

2.2.2. 蔷薇科果树 *SOT* 基因序列分析

蔷薇科果树 *SOT* 基因序列从各基因组数据库中获得, 基因的内含子/外显子特征利用在线软件 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行分析[17]。氨基酸序列分子量、理论等电点、脂溶指数和不稳度指数等蛋白理化特性利用在线工具 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)进行分析。亚细胞定位利用 MBC (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)进行预测[18]。*PbSOT* 基因启动子序列分析采用基因上游的 1500 bp 序列通过在线软件 PlantCAREWebsite (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) [19]进行。蛋白序列 motif 利用在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/>) [20]进行分析,参数设置: motif 数量为 20 个, motif 的宽度最小为 6, 最大为 50。染色体信息从各基因组数据库注释信息中获得, 染色体定位图利用软件 circos 完成。

2.2.3. 蔷薇科果树 *SOT* 基因进化分析

蔷薇科果树 *SOT* 基因的进化树以 *SOT* 的蛋白序列为模板, 系统进化树利用软件 MEGA7.0 采用 NJ 的方法来构建, 采用泊松分布来构建 NJ 模型, Bootstrap 值设置为 1000 [21], 参数选择 p-distance 和两两删除选项。

同源基因对从基因组的复制数据库中的(PGDD)中获得[22], K_a 、 K_s 和 K_a/K_s 值利用软件 KaKs_Calculator 2.0 在默认参数的条件下计算。

2.2.4. 白梨 *PbSOT* 基因定量表达分析

采用多酚多糖 RNA 提取试剂盒(有晴生物技术有限公司)提取总 RNA, 采用试剂盒 TransScript[®]

One-Step RT-PCR SuperMix (北京全式金生物技术有限公司)反转录 RNA 为 cDNA, 合成的 cDNA 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析。荧光引物利用软件 Primer5.0 设计, 荧光定量 PCR 仪为罗氏 lightCycler 480 II, 反应试剂为 SYBR Premix ExTaq™ (TaKaRa), 以 *Pbrublin* 为内参基因,不同样品得到的数据经内参基因均一化处理后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[23]计算基因的相对表达量。应用 Microsoft Excel 2010 版本进行试验数据的处理与分析。实时荧光定量 PCR 的引物见表 1。

3. 结果与分析

3.1. 蔷薇科果树 *SOT* 基因的筛选与鉴定

以 MdSOT1、MdSOT2、MdSOT3、MdSOT4 和 MdSOT5 蛋白序列为模板分别在各蔷薇科果树基因组数据库进行 Blastp, 获得同源序列共 81 个: 梨 26 个、苹果 23 个、桃 12 个、草莓 4 个、梅 12 个、黑树莓 4 个。通过 Pfam 数据库分析所有候选基因保守结构域, 移除与 AtPLT 家族基因保守结构域 Sugar_tr(PF00083.22)不一致的序列, 并在 NCBI 保守结构数据库 CCD 中进一步验证其保守结构域, 将获得的拟南芥蛋白序列分别与各物种同源序列利用软件 MEGA7.0 构建系统进化树进行聚类分析, 与苹果已经报道的 5 个 *MdSOT* 基因聚为一类的为候选基因。并通过在线软件 MEME 进一步分析目的基因蛋白序列保守 motif, 最终获得六个蔷薇科果树物种 *SOT* 基因 62 个: 梨 24 个, 苹果 17 个, 桃 9 个, 草莓 2 个, 梅 9 个, 黑树莓 2 个见表 2。

Table 1. Forward (F) and reverse (R) primers of *PbSOT* for qRT-PCR
表 1. *PbSOT* 基因家族成员用于 qRT-PCR 分析的引物序列

基因 Name	登陆号 ID	正向引物 Forward sequence (5'→3')	反向引物 Reverse sequence (5'→3')	产物 (bp)	Tm 值
<i>PbSOT1/2</i>	Pbr037512.1/ Pbr018464.1	GGGATAACCAACTCCGACCACA	CGGCAACACTAGATAGAAGCAACG	109	65
<i>PbSOT3</i>	Pbr038549.1	GCATGGTTGTTCTTCTATACGATGCTTCCG	CATGCCACTCTTATTATTGCCATCACCACCA	136	65
<i>PbSOT4</i>	Pbr038546.1	GTGAAGACAACAAGGGTCAAATCCACTAGG	TTCCGCACAAGTTATTCCTCAACTTGAAAAAG	166	65
<i>PbSOT5</i>	Pbr018903.1	CAAGGCCATCACGATCGGTGGTGC	GCACCTTTGGCTTTTCTCAGCAGCTTCC	174	65
<i>PbSOT6</i>	Pbr018463.1	GGCTGACCGGACAATAACGATAATACAG	CCCAGCAAGATTGAAGTCATCGAAGCC	117	65
<i>PbSOT7/8</i>	Pbr018910.1/ Pbr018908.1	AGCTAAGCAAGCTGATGGCGACG	ATCAGGAAACCACCATCCATCATCAAGTGC	112	65
<i>PbSOT9</i>	Pbr037515.1	GGTAAATATTTTCAGGTGGAGAACAGCCAATGC	CAACGGAGCTTCCGATAGTTCATTTCG	198	65
<i>PbSOT10</i>	Pbr038547.1	CTCAGGAATTTCTGCTGCCGCTTGG	CAACTGACGTACCCGATACTTCATTTCGAC	266	65
<i>PbSOT11</i>	Pbr034137.1	GCTGATCAGAGATCAAGACATAACGTCGTCTC	CATAACCCAGTCAGATAGATGTCATCGAAGC	117	65
<i>PbSOT12</i>	Pbr022830.1	TATCAGGTATAGACTCTGTGGTGTCTGACAGC	ACCGTAAAGACCCACACCAAGCAGTATAAAG	199	65
<i>PbSOT13</i>	Pbr040466.1	TGTAGTAGAAGTGATTGGTCTGTGTTGTGAC	GCCTATATTTACTAGAGAGATGCGGCAGAG	219	65
<i>PbSOT14</i>	Pbr018906.1	CAGGAGTCACTTCTCACAATGACAAGCTAC	TGGGGATTGATCAACGACAGTAAGACCC	168	65
<i>PbSOT16</i>	Pbr034138.1	GCTTATGTCAGATCTATGTACAGATATTGGTG	AAACATGAGGAAGGCGTAGTTCGGG	234	65
<i>PbSOT19/21</i>	Pbr018465.1/ Pbr037514.1	CTGTTGGTTGGATCTTCTTGTTCACAATGCTC	GCTAAGAGGTTACCCCTGTTGTCCGG	161	65
<i>PbSOT20</i>	Pbr037511.1	GCCGCCGTTTTGTGCATTAC	GACCCCACTACCACCCTGTT	141	65
<i>PbSOT22</i>	Pbr038548.1	TATGTCGGTCTTCTCAATTGGGATTGGGC	CCAACAATGCCGATGGCCGCATAAAG	186	65
<i>PbSOT23</i>	Pbr019075.1	CATTGCCATGTATGGGGTAGCCG	GTCTTGTTAAGCATGGCATTGGCTTCTCTC	216	65
<i>PbSOT24</i>	Pbr018904.1	CGGTGTGGCCTTCTTCTTTACATGGG	GCTTAGTCTTGTTAAGCATGGCATTGGC	136	65
<i>Pbrublin</i>	AB239681	TGGGCTTTGCTCCTCTTAC	CCTTCGTGCTCATCTTACC	169	65

Table 2. *SOT* genes in fruit tree of *Rosaceae*
表 2. 蔷薇科果树 *SOT* 基因

物种名 Species name	基因名 Gene name	基因 ID Gene ID	物种名 Species name	基因名 Gene name	基因 ID Gene ID
白梨	PbSOT1	Pbr037512.1	苹果	MdSOT2.7	MDP0000197939
<i>Pyrus bretschneideri</i>	PbSOT2	Pbr018464.1	<i>Malus domestica</i>	MdSOT2.8	MDP0000311500
	PbSOT3	Pbr038549.1		MdSOT2.9	MDP0000595941
	PbSOT4	Pbr038546.1		MdSOT3	MDP0000896307
	PbSOT5	Pbr018903.1		MdSOT3.2	MDP0000596275
	PbSOT6	Pbr018463.1		MdSOT3.3	MDP0000285032
	PbSOT7	Pbr018910.1		MdSOT4	MDP0000296050
	PbSOT8	Pbr018908.1		MdSOT5	MDP0000841918
	PbSOT9	Pbr037515.1		MdSOT5.2	MDP0000940086
	PbSOT10	Pbr038547.1		MdSOT5.3	MDP0000787701
	PbSOT11	Pbr034137.1	桃	PpSOT1	Prupe.8G100700
	PbSOT12	Pbr022830.1	<i>Prunuspersica</i>	PpSOT2	Prupe.8G100900
	PbSOT13	Pbr040466.1		PpSOT3	Prupe.8G101000
	PbSOT14	Pbr018906.1		PpSOT4	Prupe.8G101200
	PbSOT15	Pbr019072.1		PpSOT5	Prupe.8G105300
	PbSOT16	Pbr034138.1		PpSOT6	Prupe.8G105400
	PbSOT17	Pbr034135.1		PpSOT7	Prupe.8G105500
	PbSOT18	Pbr019074.1		PpSOT8	Prupe.8G105600
	PbSOT19	Pbr018465.1		PpSOT9	Prupe.8G101500
	PbSOT20	Pbr037511.1	梅	PmSOT1	Pm021605
	PbSOT21	Pbr037514.1	<i>Prunusmume</i>	PmSOT2	Pm021606
	PbSOT22	Pbr038548.1		PmSOT3	Pm021647
	PbSOT23	Pbr019075.1		PmSOT4	Pm021648
	PbSOT24	Pbr018904.1		PmSOT5	Pm021649
苹果	MdSOT1	MDP0000755167		PmSOT6	Pm021715
<i>Malus domestica</i>	MdSOT2	MDP0000688348		PmSOT7	Pm030070
	MdSOT2.2	MDP0000141961		PmSOT8	Pm031233
	MdSOT2.3	MDP0000250395	草莓	FvSOT1	gene20355
	MdSOT2.4	MDP0000688376	<i>Fragaria vesca</i>	FvSOT2	gene20372
	MdSOT2.5	MDP0000682530	黑树莓	RoSOT1	Bras_G21340
	MdSOT2.6	MDP0000276801	<i>Rubusoccidentalis</i>	RoSOT2	Bras_G27239

3.2. 蔷薇科果树 *SOT* 基因的基本信息

蔷薇科果树 *SOT* 基因 CDS 序列长度在 1062 bp (*MdSOT1*)-2430 bp (*MdSOT2.8*)之间。其中, 苹果 *MdSOT1* (1062 bp)基因序列最短, *MdSOT2* (8591 bp)基因序列最长。*SOT* 基因家族编码的蛋白序列长度为 524 aa, 相对分子质量在 38.5 kda (*MdSOT1*)~88.326 kda (*MdSOT2.8*)之间。除了 *PbSOT19* 理论等电点(pI) <

7, 显酸性, 其他 *SOT* 基因的理论等电点(pI) > 7, 显碱性。最大疏水系数在 0.251~0.561 之间(>0), 为疏水性蛋白见表 2。对 *SOT* 基因家族蛋白序列进行跨膜结构分析发现, *SOT* 基因均存在 10 个以上跨膜结构, 且在第六和第七个跨膜区间存在一个 100 aa 大小的亲水 loop。

3.3. 蔷薇科果树 *SOT* 基因系统进化及结构分析

蔷薇科 62 个 *SOT* 基因家族基本上有一个相似的内含子外显子结构, 但内含子和外显子数量以及位置是不一样的。蔷薇科果树 *SOT* 基因包含 0-5 个内含子, 大多数 *SOT* 基因的内含子数量在 1~3 之间, 除了 *MdSOT1* 没有内含子, *MdSOT2.8*、*MdSOT3.3*、*MdSOT4* 有 4 个内含子, *MdSOT2*、*PmSOT7* 有 5 个内含子(图 1 右)。motif 分析表明, 蔷薇科果树 *SOT* 基因的 motif 数量和分布具有相似性, 其中 motif 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、16、17 是 *SOT* 基因家族比较重要且保守的结构(图 1 中)。蔷薇科果树 *SOT* 基因家族所有成员均含有 motif1 和 motif17, 几乎所有 *SOT* 基因均 motif2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、16。 *SOT* 家族成员在各个亚枝的核苷酸水平和蛋白水平的序列结构差异小, 说明 *SOT* 是典型的同源进化[24]。

3.4. 共线性分析

蔷薇科果树 *SOT* 基因家族中, 一共有 24 对直系同源基因和 2 对旁系同源基因见表 3。直系同源基因对的 Ka/Ks 的值均小于 1, 说明纯化选择在 *SOT* 基因家族进化过程中起主要作用。其中, *FvSOT1*-*MdSOT5* 的 Ks 值比较大, 说明 *FvSOT1* 和 *MdSOT5* 分化早, 然而相对其他 Ks 较大的基因对其 Ka/Ks 的值比较小, 说明从 *FvSOT1* 到 *MdSOT5* 的进化过程比较保守。

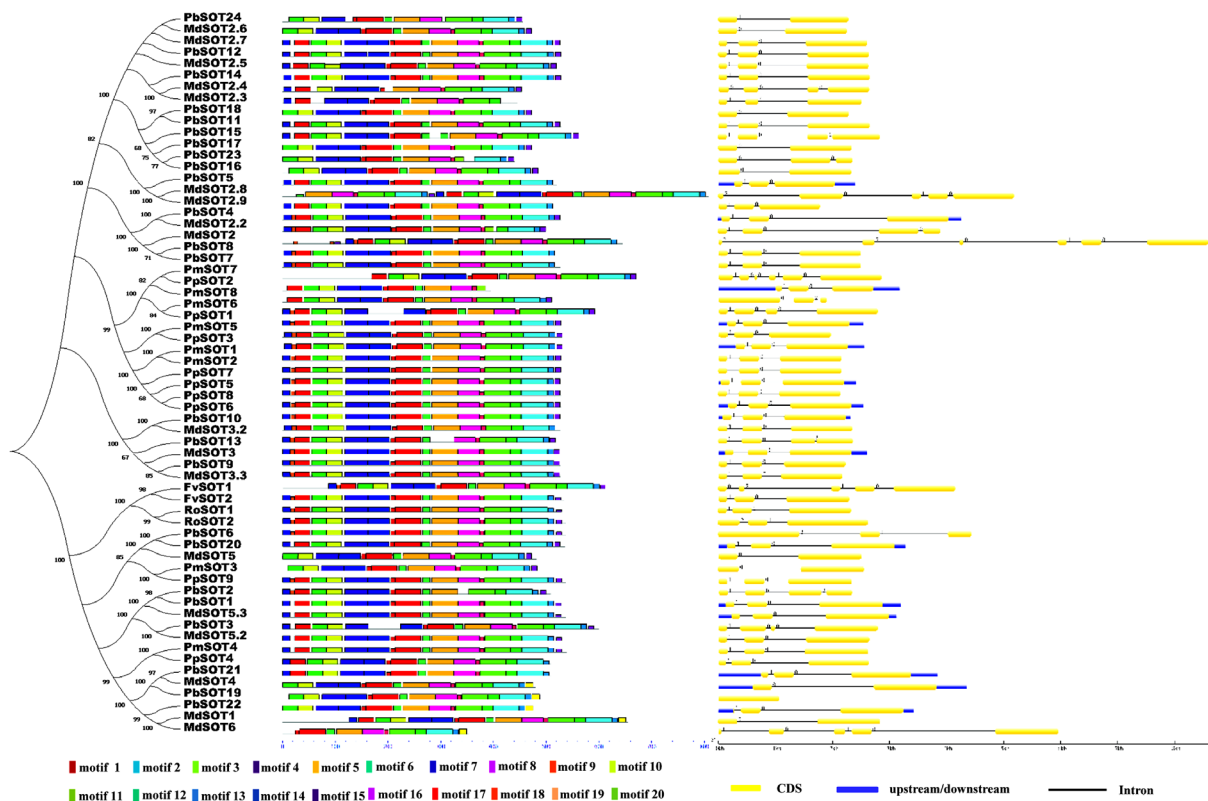


Figure 1. Evolutionary analysis of *SOT* genes in *Rosaceae*

图 1. 蔷薇科果树 *SOT* 基因进化分析

Table 3. The Ka/Ks analysis of homologous *SOT* genes in fruit tree of *Rosacea*
表 3. 蔷薇科果树 *SOT* 基因家族直系和旁系同源基因 Ka/Ks 值

同源基因对 Homologous genes	Ka	Ks	Ka/Ks	P/O	同源基因对 Homologous genes	Ka	Ks	Ka/Ks	P/O
MdSOT3-PbSOT13	0.025992	0.0678	0.383364	O	MdSOT3-PpSOT1	0.155157	0.992621	0.156311	O
PmSOT6-PpSOT1	0.017247	0.082737	0.208451	O	MdSOT5-PpSOT4	0.137058	1.00549	0.136309	O
MdSOT2-PbSOT14	0.02802	0.12346	0.226959	O	PmSOT3-RoSOT1	0.115149	1.0113	0.113863	O
PmSOT3-PpSOT4	0.136959	0.634743	0.215771	O	RoSOT1-PmSOT3	0.115149	1.0113	0.113863	O
PmSOT5-PpSOT2	0.138747	0.638019	0.217465	O	RoSOT1-PbSOT6	0.113313	1.21325	0.093396	O
PbSOT6-PmSOT3	0.088818	0.697867	0.127271	O	PpSOT1-RoSOT1	0.187404	1.4701	0.127477	O
MdSOT3-PbSOT7	0.122466	0.734647	0.1667	O	RoSOT1-PpSOT1	0.187404	1.4701	0.127477	O
MdSOT2-PbSOT5	0.105495	0.743119	0.141963	O	FvSOT2-PpSOT3	0.177523	2.22591	0.079753	O
MdSOT3-PmSOT5	0.149356	0.764935	0.195253	O	FvSOT2-PbSOT7	0.167064	3.5304	0.047322	O
PbSOT8-PpSOT1	0.122067	0.847723	0.143994	O	FvSOT2-MdSOT4	0.188193	3.93078	0.047877	O
PbSOT8-PmSOT6	0.10939	0.891309	0.122729	O	FvSOT1-MdSOT5	0.099348	4.52976	0.021932	O
PbSOT6-PpSOT4	0.138334	0.918762	0.150566	O	PbSOT12-PbSOT2 3	0.04434	0.178281	0.24871	P
MdSOT4-PbSOT2	0.174756	0.987376	0.17699	O	PbSOT5-PbSOT23	0.132086	0.896826	0.147282	P

注: P: 旁系同源; O: 直系同源 Nd: P: Paralogs; O: Ortholog

SOT 基因进化中比较保守也体现在结构的变异度比较小。*PbSOT6-PmSOT3*, *PbSOT6-PpSOT4* 和 *RoSOT1-PbSOT6* 的 Ka/Ks 偏小, *PbSOT6*, *PmSOT3*, *PpSOT4* 和 *RoSOT1* 基因结构上都具有 2 个内含子和 3 个外显子的特征, 说明在选择压力下, 核苷酸序列保持相对一致性, 所以 *PbSOT6*, *PmSOT3*, *PpSOT4* 和 *RoSOT1* 在进化过程中比较保守。蔷薇科果树物种 *SOT* 基因的 Ks 值如表 3 所示, 其中一部分同源基因对的 Ks 值比较大(Ks~2.3~4.6), 说明它们起源于一个更古老的重复事件。

3.5. *PbSOTs* 基因家族基因启动子序列分析

在白梨中, *PbSOTs* 基因对逆境有一定的抵抗作用。为了确定启动子区域与逆境相关的元件, 通过在线软件 PLantCARE 分析 *PbSOTs* 基因上游 1500 bp 序列。*PbSOTs* 基因启动子区除了存在大量的启动子元件 CAAT-box 和 TATA-box 外, 还丰富存在参与光相应顺式调控元件, 例如: ACE、ATCT-motif、Box 4、G-Box、GAG-motif、I-box、Sp1、TCCC-motif、chs-CMA1a、GT1-motif 等, 并包含大量与逆境相关的元件, 包括厌氧相关的元件 ARE、真菌诱导元件 Box-W1、热激相关元件 HSE、干旱诱导元件 MBS、低温响应元件 LTR、预防和胁迫应答的相应元件 TC-richrepeats 等。与激素相关的元件, 如: MeJA 响应元件 CGTCA-motif、脱落酸响应元件 ABRE、乙烯反应元件 ERE、水杨酸响应元件 TCA-element、赤霉素应答顺时调控元件 GARE-motif 等(图 2)。

3.6. 白梨 *PbSOTs* 基因组织表达特性

PbSOTs 在白梨中存在明显的时空表达特异性。由于 *PbSOT1* 和 *PbSOT2*, *PbSOT7* 和 *PbSOT8* 以及 *PbSOT19* 和 *PbSOT21* 两两之间存在高度的序列相似性, 无法设计特异引物, 因此设计的引物的扩增结果为这两个成员的表达之和, 以 *PbSOT1/2*, *PbSOT7/8* 和 *PbSOT19/21* 标识。在根中, *PbSOT6* 和 *PbSOT19/21* 的表达水平很高, *PbSOT1/2*、*PbSOT3*、*PbSOT20* 和 *PbSOT22* 表达水平较低, 而其他基因几乎不表达。在茎中, *PbSOT1/2*、*PbSOT3*、*PbSOT7/8*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT20* 的表达水平很高, *PbSOT4*、*PbSOT5*、

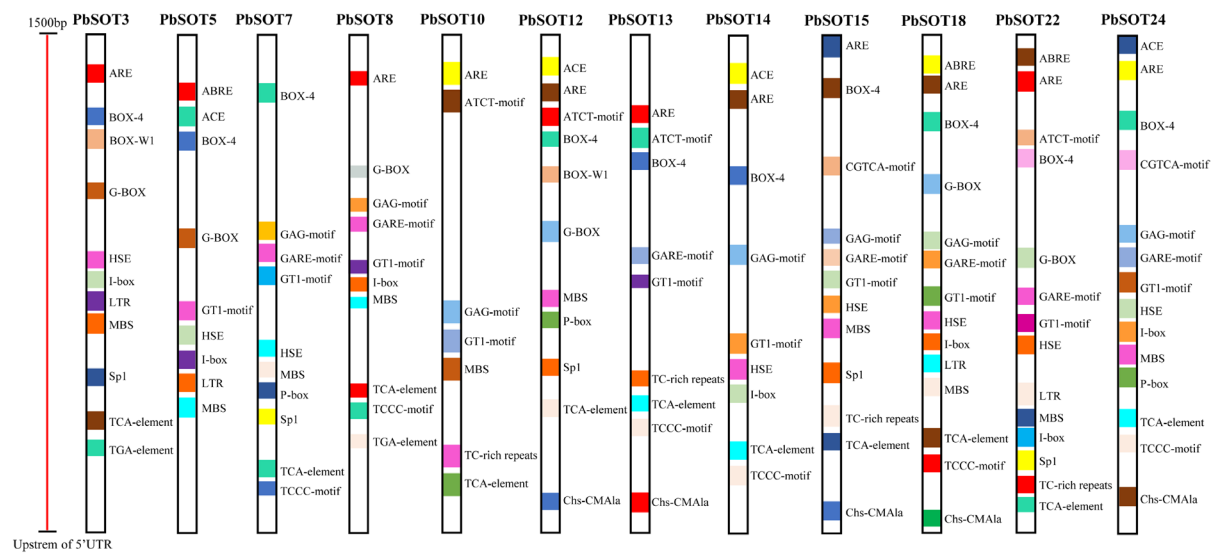


Figure 2. Types of stress-related elements in the promoter regions of *PbSOTs* genes

图 2. *PbSOTs* 启动子区域和逆境相关的元件类型

PbSOT6、*PbSOT9* 和 *PbSOT22* 均有表达,其他基因几乎不表达。在花中,*PbSOT1/2*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT20* 的表达水平很高, *PbSOT3*、*PbSOT5*、*PbSOT6*、*PbSOT7/8* 和 *PbSOT22* 表达水平相对较低,其他成员几乎不表达。在叶中, *PbSOT20* 的表达水平极高, *PbSOT3*、*PbSOT6*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT22* 表达水平相对较低,其他成员几乎不表达。在果实中, *PbSOT20* 的表达水平也极高, *PbSOT3*、*PbSOT6*、*PbSOT7/8*、*PbSOT9*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT22* 表达水平相对较低,其他成员几乎不表达。在种子中, *PbSOT20* 同样表现出了极高的表达水平, *PbSOT6* 表达水平次之,其它成员表达量极低或不表达。因此,根中的山梨醇转运主要依赖于 *PbSOT6* 和 *PbSOT19/21*,茎中的山梨醇转运主要依赖于 *PbSOT1/2*、*PbSOT3*、*PbSOT7/8*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT20*,花中的山梨醇转运主要依赖于 *PbSOT1/2*、*PbSOT19/21* 和 *PbSOT20*,叶、果和种子中的山梨醇转运均依赖于 *PbSOT20* (图 3)。

4. 讨论

4.1. *SOT* 基因家族的基本特性

山梨醇转运蛋白(*SOT*)是 *PLT* 家族的一个亚家族,主要定位在质膜上,属于高疏水性蛋白,具有典型的 MFS 超家族的结构域“sugar_tr”,是山梨醇运输过程的主要转运蛋白。本文从蔷薇科梨、苹果、桃、梅、草莓和黑树莓 6 个果树物种中共筛选鉴定出 62 个 *SOT* 基因,并对其理化性质、系统进化、基因结构、motif 和基因表达量等分析。结果表明, *SOT* 家族基因主要显碱性,有 10 个以上的跨膜结构。在第六和第七个跨膜区间有一个 100 aa 大小的亲水 loop 结构。*PbSOT6*-*PmSOT3*, *PbSOT6*-*PpSOT4* 和 *RoSOT1*-*PbSOT6* 在进化过程中比较保守,通过比较它们的 motif 发现这四个基因中有个别基因没有 motif15 和 motif18,推测这两个 motif 并非是 *SOT* 保守蛋白结构所特有的。

山梨醇是重要的渗透调节物质,在植物响应生物和非生物胁迫中起作用。*PbSOTs* 基因的上游启动子区存在一些顺式作用元件可调控基因的表达并响应胁迫作用。有研究表明,如受干旱胁迫时苹果根、韧皮部及叶片等源器官内山梨醇含量上升,同时 *MdSOT3* 和 *MdSOT5* 在上述部位的表达量也显著上升[24]。冷藏期间 *PpSOT3*、*PpSOT4*、*PpSOT8*、*PpSOT25*、*PpSOT32* 和 *PpSOT33* 表达明显上调,与冷藏期间果实山梨醇含量趋于下降相对应[10]。*PbSOTs* 家族基因启动子区不仅有光响应顺式调控元件对果实生长发

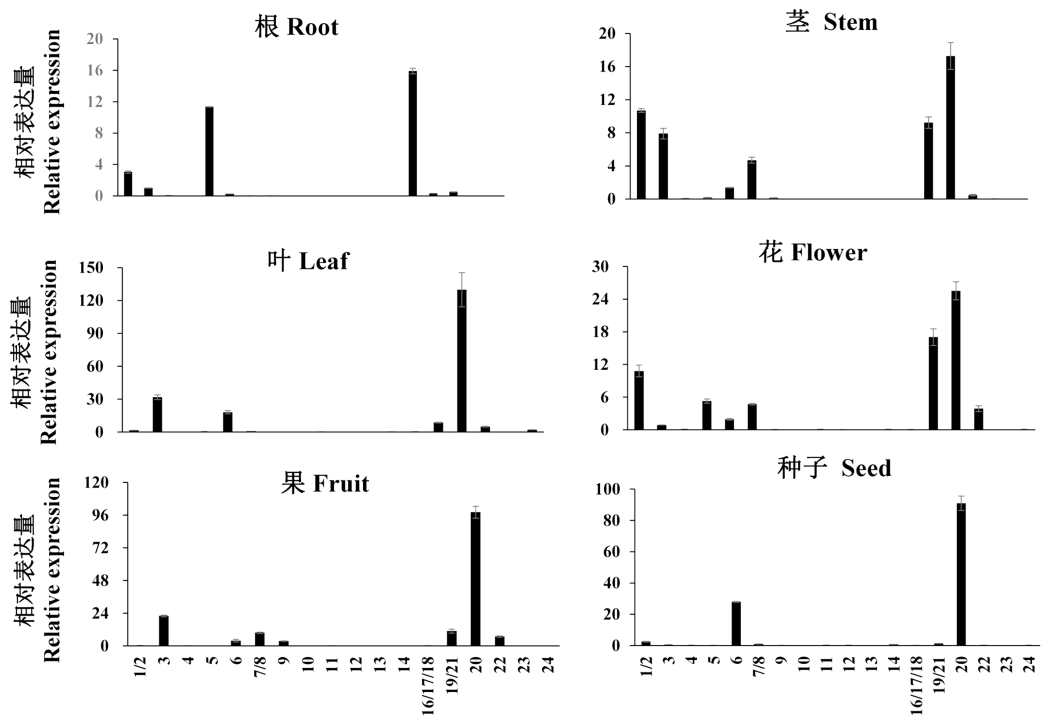


Figure 3. Tissue specificity of gene family members of *PbSOTs* gene
图 3. *PbSOTs* 基因家族成员的组织特异性表达

育和糖分的分配有一定的作用，还存在逆境相关元件，说明 *PbSOTs* 不仅参与了山梨醇转运，同时参与了植物抗逆过程。

4.2. 蔷薇科果树 *SOT* 基因进化关系

蔷薇科果树中 *SOT* 基因分布不均，白梨 24 个、苹果 17 个、桃 9 个、梅 9 个、草莓 2 个、黑树莓 2 个。

基于 K_s 的研究，苹果进化过程中出现过两次全基因组重复事件：三倍体加倍(γ) ($K_s \sim 1.6$)和近代全基因组复制($K_s \sim 0.2$) [11]；梨进化过程中三倍体加倍(γ) ($K_s \sim 1.5-1.8$)发生在 1.40 亿年前[15]，近代全基因组复制($K_s \sim 0.15 \sim 0.3$)发生在 0.30~0.45 亿年前[11] [15]，*SOT* 基因家族的祖先基因($K_s \sim 2.3 \sim 4.6$)发生在三倍体事件之前。对蔷薇科果树 *SOT* 基因家族直系同源基因对分析发现，其 K_a/k_s 值均小于 1，结合蛋白水平和核苷酸水平的分析比较，*SOT* 基因家族在进化过程中高度保守，因此在进化过程中纯化选择(阳性选择)在 *SOT* 基因家族中有主要作用。

4.3. *PbSOTs* 基因的组织表达特性

果实中糖的含量由植物中的碳分配系统决定，碳分配是植物通过光合作用转化而来的化学能量的一个重要过程。梨及其它多数蔷薇科物种中“源-库”系统与多数陆生植物相比存在差异，主要体现在从“源”到“库”的迁移形式上，前者主要是山梨醇，而后者主要是蔗糖[25]。果实中的糖分是由糖转运蛋白从源器官通过韧皮部装载、卸载，以蔗糖或山梨醇形式运输而来的。在光合产物从叶运输到果实的过程中，有关运输糖类物质的糖转运蛋白及跨膜运输具体过程和部位引起研究者的广泛关注。苹果基因组中有 17 个表达的 *MdSOT* 基因家族成员，呈现各不相同的组织与时空特异性表达模式[26]。其中，*MdSOT3*、*MdSOT4* 和 *MdSOT5* 在种子和幼果种不表达，但 *MdSOT3* 仅在成熟叶片中表达，在幼叶中检测不到表达；

MdSOT4、*MdSOT5* 不仅在幼叶和成熟叶中都有表达, 而且在花和冬芽中都有表达[6]。*MdSOT7* 在不同叶龄叶片中都有少量表达, 且表达量基本不变; *MdSOT8* 和 *MdSOT10* 在幼叶中基本不表达, 但随着叶片的成熟表达量开始增加, 老叶中的表达量最大; *MdSOT9* 的表达模式与 *MdSOT8* 和 *MdSOT10* 相似, 但当叶片衰老时表现出相反的趋势[27]。在梨中, 我们发现 *PbSOT11*、*PbSOT12*、*PbSOT14*、*PbSOT16*、*PbSOT23* 和 *PbSOT24* 在白梨各组织中几乎都不表达; *PbSOT5* 仅在花中表达; *PbSOT4* 在白梨各组织中也都不表达, *PbSOT7/8* 仅在茎、花、果中表达; *PbSOT10* 和 *PbSOT13* 在白梨各组织中同样都不表达, *PbSOT9* 仅在果实中表达; *PbSOT6* 和 *PbSOT20* 在所有组织中均表达; *PbSOT1/2* 在根、茎、花和种子中表达, 而 *PbSOT3* 和 *PbSOT19/21* 和 *PbSOT22* 在根、茎、花、叶和果实中表达。比较同一组织中的基因表达水平, 发现根、茎和花中存在多个表达水平较高的 *SOT* 基因, 而叶、果和种子中仅存在一个表达水平极高的 *PbSOT20* 基因, 且该基因在茎和花中的表达水平也极高, 说明 *PbSOT20* 是梨山梨醇“源-库”迁移的主要调控基因。而在“源-库”之外的根组织中, 山梨醇的转运更有可能依赖于 *PbSOT6* 和 *PbSOT19/21* 的协同作用。

参考文献

- [1] Klages, K., Donnison, H., Wünsche, J. and Bolding, H. (2001) Diurnal Changes in Non-Structural Carbohydrates in Leaves Phloem Exudate and Fruit in “Braeburn” Apple. *Plant Physiol*, **28**, 131-139.
- [2] Zhang, H.P., Wu, J.Y., Tao, S.T., Qi, K.J., Zhang, S.J., Wang, J.Z., Huang, W.J., Wu, J. and Shang, L.Z. (2014) Evidence for Apoplasmic Phloem Unloading in Pear Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, **32**, 931-939. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0696-7>
- [3] Larher, F.R., Lugin, R., Gagneul, D., Guyot, S. and Monnier, C. (2009) A Reassessment of the Prevalent Organic Solutes Constitutively Accumulated and Potentially Involved in Osmotic Adjustment in Pear Leaves. *Environmental and Experimental Botany*, **66**, 230-241. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.02.005>
- [4] Yamaki, S. (2010) Metabolism and Accumulation of Sugars Translocated to Fruit and Their Regulation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **79**, 1-15.
- [5] Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.D., van Nocker, S. and Loescher, W. (2003) Cloning, Expression and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues. *Plant Physiology*, **131**, 1566-1575. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016725>
- [6] Gao, Z., Jayanty, S., Beaudry, R. and Loescher, W. (2005) Sorbitol Transporter Expression in Apple Sink Tissues: Implications for Fruit Sugar Accumulation and Watercore Development. *AmerSocHortSci*, **130**, 261-268.
- [7] Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T. and Shiratake, K. (2004) Identification of Sorbitol Transporters Expressed in the Phloem of Apple Source Leaves. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1032-1041. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch121>
- [8] Fan, R.C., Peng, C.C., Xu, Y.H., Wang, X.F. and Li, Y. (2009) Apple Sucrose Transporter Sut1 and Sorbitol Transporter Sot6 Interact with Cytochrome *b5* to Regulate Their Affinity for Substrate Sugars. *Plant Physiology*, **150**, 1880-1901. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141374>
- [9] Wang, L.F., Qi, X.X., Yang, Y.N. and Shang, L.Z. (2015) Molecular Characterization and Expression Pattern of Sorbitol Transporter Gene *PbSOT2* in Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) Fruit. *Canadian Journal of Plant Science*, **96**, 128-138. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0118>
- [10] 戴美松, 徐飞, 施泽彬, 徐昌杰. 砂梨山梨醇转运蛋白(SOT)基因家族成员表达特性及在果实糖积累中的作用初探[J]. 园艺学报, 2015, 42(8): 1457-1466.
- [11] Wu, J., Wang, Z. and Shi, Z. (2013) The Genome of the Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Genome Research*, **23**, 396-408. <https://doi.org/10.1101/gr.144311.112>
- [12] Velasco, R., Zharkikh, A. and Affourtit, J. (2010) The Genome of the Domesticated Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, **42**, 833-839. <https://doi.org/10.1038/ng.654>
- [13] Shulaev, V., Sargent, D.J. and Crowhurst, R.N. (2010) The Genome of Woodland Strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, **43**, 109-116. <https://doi.org/10.1038/ng.740>
- [14] Zhang, Q.X., Chen, W.B. and Sun, L.D. (2012) The Genome of *Prunus mume*. *Nature Communications*, **3**, 1318. <https://doi.org/10.1038/ncomms2290>
- [15] Verde, I., Abbott, A.G. and Scalabrin, S. (2013) The High-Quality Draft Genome of Peach (*Prunus persica*) Identifies Unique Patterns of Genetic Diversity, Domestication and Genome Evolution. *Nature Genetics*, **45**, 487-U447.

<https://doi.org/10.1038/ng.2586>

- [16] VanBuren, R., Bryant, D., Bushakra, J.M. and Vining, K.J. (2016) The Genome of Black Raspberry (*Rubus occidentalis*). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **87**, 535-547. <https://doi.org/10.1111/tpj.13215>
- [17] Hu, B., Jin, J.P., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J.C. and Gao, G. (2015) GSDS2.0: An Upgraded Gene Feature Visualization Server. *Bioinformatics*, **31**, 1296-1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- [18] Yu, C.S., Lin, C.J. and Hwang, J.K. (2004) Predicting Subcellular Localization of Proteins for Gram-Negative Bacteria by Support Vector Machines Based on N-Peptide Compositions. *Protein Science*, **13**, 1402-1406. <https://doi.org/10.1110/ps.03479604>
- [19] Postel, D., Vanlemmens, P., Gode, P., Ronco, G. and Villa, P. (2002) Plant CARE, a Database of Plant cis-Acting Regulatory Elements and a Portal to Tools for in Silico Analysis of Promoter Sequences. *Nucleic Acids Research*, **30**, 325-327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
- [20] Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C. and Li, W.W. (2006) MEME: Discovering and Analyzing DNA and Protein Sequence Motifs. *Nucleic Acids Research*, **34**, W369-W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl198>
- [21] Tamura, K., Stecher, G. and Peterson, D. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- [22] Lee, T.H., Tang, H., Wang, X. and Paterson, A.H. (2013) PGDD: A Database of Gene and Genome Duplication in Plants. *Nucleic Acids Research*, **41**, D1152-D1158.
- [23] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [24] Li, F., Lei, H.J. and Zhao, X.J. (2012) Isolation and Characterization of Two Sorbitol Transporter Gene Promoters in Micropropagated Apple Plants (*Malus × Domestica*) Regulated by Drought Stress. *Plant Growth Regulation*, **68**, 475-482. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9737-8>
- [25] Shanguan, L., Song, C. and Leng, X. (2014) Mining and Comparison of the Genes Encoding the Key Enzymes Involved in Sugar Biosynthesis in Apple, Grape, and Sweet Orange. *Scientia Horticulturae*, **165**, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.026>
- [26] Wei, X.Y., Liu, F.L., Chen, C., Ma, F. and Li, M. (2014) The *Malus Domestica* Sugar Transporter Gene Family: Identifications Based on Genome and Expression Profiling Related to the Accumulation of Fruit Sugars. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 569. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00569>
- [27] 梁东. 苹果山梨醇代谢相关基因的分子特性研究[D]: [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林大学, 2010.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org