

• 研究报告 •

梁博文 河北农业大学教授、博士研究生导师，主要从事果树逆境生理与生物化学研究，研究内容主要为次生代谢物质对逆境胁迫下果树养分高效吸收利用的调控。主持国家自然科学基金、河北省自然科学基金和河北省高等学校青年拔尖人才项目等 5 项。以第一作者或通讯作者在 *Journal of Pineal Research*、*Environmental and Experimental Botany*、*Scientia Horticulturae* 等国际期刊发表文章 10 余篇。*Frontiers in Plant Science* 期刊客座主编。



苹果 *MdPEPC* 基因家族鉴定及在腋芽萌发中的作用

李九洋, 时聪健, 孙亚硕, 高彩桢, 张曜辉, 檀鸣, 梁博文

河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071000

李九洋, 时聪健, 孙亚硕, 高彩桢, 张曜辉, 檀鸣, 梁博文. 苹果 *MdPEPC* 基因家族鉴定及在腋芽萌发中的作用. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3728-3739.

LI JY, SHI CJ, SUN YS, GAO CZ, ZHANG YH, TAN M, LIANG BW. Genome-wide identification and effect of *MdPEPC* family genes during axillary bud outgrowth in apple (*Malus domestica* Borkh.). Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3728-3739.

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPC) 家族蛋白普遍存在各种植物中, 在光合碳同化过程中起到重要作用, 同时具有多种非光合生物学功能, 但 *PEPC* 基因在苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 中尚未研究报道。本研究以苹果新基因组数据为基础, 利用生物信息学方法对苹果 *PEPC* 家族成员 (the members of apple *PEPC* family, *MdPEPC*) 进行鉴定, 并对其在不同组织中的表达谱以及去顶和细胞分裂素噻重氮苯基脲 (thidazuron, TDZ) 处理后苹果腋芽转录组中的表达模式进行分析, 以期探究 *MdPEPC* 基因在参与苹果腋芽萌发中的作用。结果表明, 苹果 *MdPEPC* 家族共有 6 个成员, 分布于 6 条不同的染色体上, 且理化特征较为相似; 系统进化树及序列比对分析显示其可分为 2 个亚组 (Group I 和 Group II), 其中 I 组含 4 个

Received: May 16, 2022; **Accepted:** July 18, 2022

Supported by: Science and Technology Project of Hebei Education Department (BJK2022012); Basic Scientific Research Funds of Provincial Universities in Hebei Province, China (KY2021054); Hebei Agricultural University Talent Introduction Scientific Research Special Project (YJ2020034)

Corresponding authors: TAN Ming. E-mail: tm010411@163.com

LIANG Bowen. E-mail: lbw@hebau.edu.cn

基金项目: 河北省教育厅科学技术研究项目 (BJK2022012); 河北省省属高校基本科研业务费研究项目 (KY2021054); 河北农业大学人才引进科研专项 (YJ2020034)

MdPEPC 家族成员, 属于植物型 PEPCs, 而 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 则与拟南芥细菌型 *AtPPC4* 聚类到 II 组; 共线性分析表明, *MdPEPC* 成员之间不存在串联重复, 含 7 对片段重复; 顺式作用元件分析显示, *MdPEPC* 家族成员不仅受光和逆境等影响, 还受多种激素综合调控; 表达谱显示, 除 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 外, 其他植物型 *MdPEPC* 在不同组织中均有表达。转录组数据分析表明, 去顶和 TDZ 处理后 *MdPEPC1* 和 *MdPEPC3* 表达量上调, 而 *MdPEPC2* 则在处理后 48 h 明显下调表达。综上所述, 本研究通过对苹果 *MdPEPC* 家族的鉴定和分析, 筛选出 *MdPEPC1*、*MdPEPC2* 和 *MdPEPC3* 作为调控苹果腋芽萌发的候选基因, 以便后期对其进行深入研究。

关键词: 苹果; *PEPC* 家族; 基因家族鉴定; 腋芽萌发; 分枝

Genome-wide identification and effect of *MdPEPC* family genes during axillary bud outgrowth in apple (*Malus domestica* Borkh.)

LI Jiuyang, SHI Congjian, SUN Yashuo, GAO Caizhen, ZhANG Yaohui, TAN Ming, LIANG Bowen

College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

Abstract: The PEPC family proteins are ubiquitous in various plants and play an important role in the process of photosynthetic carbon assimilation and have many non-photosynthetic biological functions. However, *PEPC* genes have not been reported in apple. In this study, the members of apple *MdPEPC* family were identified based on the new apple genome data by bioinformatics analysis, and their expression patterns in different tissues and the apple axillary bud transcriptome treated by decapitation and TDZ (cytokinin) were analyzed in order to explore the role of *MdPEPC* genes in apple axillary bud outgrowth. The results showed that 6 *MdPEPC* family members were identified in apple, which distributed on 6 different chromosomes, and had similar physicochemical characteristics. Phylogenetic tree and sequence alignment analysis showed that the *MdPEPC* could be divided into two subgroups (Group I and Group II), in which four members in *MdPEPC* family were clustered into Group I, belonging to plant-type PEPCs. However, *MdPEPC4* and *MdPEPC5* were clustered into Group II with *AtPPC4*, belonging to bacterial-type PEPCs. There were 7 pairs of fragments repeats among *MdPEPC* members, but no tandem repeats existed. The promoter *cis*-acting element analysis showed that *MdPEPC* genes were not only affected by light and stress, but also regulated by multiple hormones. The expression profiles showed that all *MdPEPCs* except *MdPEPC4* and *MdPEPC5* were expressed in different apple tissues. Transcriptome data analysis showed that the expression levels of *MdPEPC1* and *MdPEPC3* were up-regulated after decapitation and TDZ treatment, whereas *MdPEPC2* was significantly down-regulated at 48 h after treatments. In conclusion, *MdPEPC1*, *MdPEPC2* and *MdPEPC3* were selected as the candidate genes involved in axillary bud outgrowth regulation for further study.

Keywords: apple; *PEPC* family; gene family identification; axillary bud outgrowth; shoot branching

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPC) 普遍存在于各种植物中, 是光合作用中极其重要的一种酶。它在 HCO_3^- 在下催化 PEP 发生 β -羧化反应, 结合 Mg^{2+} 产生草酰乙酸 (oxaloacetic acid, OAA) 和 P_i ^[1], 此反应步骤是 C4 植物和景天酸代谢植物固定和同化 CO_2 的重要步骤, 对其光合作用有重要意义^[2]。据报道, PEPC 不仅在光合作用和糖积累^[3-4]中发挥重要作用, 在其他生物学过程中也处于关键地位。如通过维持植物细胞离子平衡, 从而调节气孔运动^[5], 调节植物的抗逆能力^[6], 参与调控果实成熟^[7], 参与豆科固氮过程^[8], 还参与种子发育过程的营养物质代谢, 控制糖类转化为脂肪或蛋白质等^[9]。

目前, PEPC 基因家族在多种植物中已有研究, 如在拟南芥中共鉴定出 4 个 PEPC 家族成员, 水稻中共鉴定出 6 个 PEPC 家族成员^[10]。PEPC 基因家族成员根据其磷酸化结构的区别, 将其分为植物型 PEPC (plant-type PEPC, PTPC) 和细菌型 PEPC (bacterial-type PEPC, BTPC) 两类, 其中细菌型 PEPC 序列的 N 端不含磷酸化结构^[11]。

苹果 (*Malus domestica*. Borkh.) 是世界四大果树之一。目前, 我国苹果栽培面积、总产量、人均占有量与出口量均居世界第一^[12], 在全世界范围内几乎各个苹果生产国都倡议采用优质多分枝苗木建园, 以达到早产、丰产的目的。有研究表明植物碳水化合物影响分枝发育^[13]。Kebrom 和 Mullet 研究发现, 光合作用的叶片面积以及植物通过光合作用产生糖的相关能力对调控植物腋芽萌发有重要作用^[14]。PEPC 基因在光合作用中发挥重要作用, 但其影响苹果腋芽萌发的研究未见报道。本研究拟在苹果全基因组中鉴定 *MdPEPC* 家族成员, 并对其理化性质、系统发育、结构特征、保守基序、顺式作

用元件、表达模型等进行分析, 并通过去顶和噻重氮苯基脲 (thidazuron, TDZ) 处理后苹果腋芽转录组数据锁定调控苹果腋芽萌发的候选基因, 为后续研究该基因在苹果腋芽萌发中的作用奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

本研究田间试验在河北省蠡县小陈乡小陈村进行, 试验材料为嫁接在八棱海棠上的一年生苹果苗木‘SH40’, 于 2021 年 7 月 4 日进行去除顶芽和 5 mmol/L 外源 TDZ 处理。选择顶梢下部饱满芽, 自上而下连续标记 6–8 个腋芽, 每组处理 30–40 株苗, 处理时直接喷施试剂到腋芽上。处理后 4、8、12、24、48 h 进行腋芽取样, 液氮速冻, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。不同处理 4–48 h 的腋芽样品由天津诺禾致源生物信息科技有限公司进行转录组测序。

1.2 蛋白质理化性质分析

在 NCBI 网站 (National Center for Biotechnology Information (nih.gov)) 下载苹果全基因组及注释信息, 在 pfam 网站 (Pfam: Home page (xfam.org)) 下载 PEPC 隐马尔可夫模型 (PF00311), 利用 TBtools 软件筛选关键结构域^[15], 确定基因家族成员, 于 ExPASy 网站 (ExPASy-ProtParam tool) 分析蛋白质理化性质^[16], Plant-mPLoc 网站 (Plant-mPLoc server (sjtu.edu.cn)) 进行亚细胞定位分析。

1.3 蛋白系统发育和保守性分析

从 NCBI 网站下载苹果和拟南芥全基因组蛋白序列, 从中提取苹果和拟南芥 PEPC 家族成员蛋白质序列, 利用 MEGA 7 软件构建 NJ 进化树。利用 DNAMAN 软件进行序列对比, 并利用 MEME-suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析蛋白质保守基序, 用 TBtools 绘制 motif 图, 基序宽度为 5 到 60, 最大基序数设为 10。

1.4 基因结构与其在染色体定位

利用 TBtools 分析基因家族成员的结构并获取基因在染色体的位置进行可视化。

1.5 顺式作用元件分析

提取苹果 *MdPEPC* 基因 5'端上游 2 000 bp 的序列作为启动子区域, 上传至 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线工具分析其顺式作用元件^[17], 利用 TBtools 进行可视化分析。

1.6 共线性分析

利用 MCScanX 进行共线性分析, 并且利用 TBtools 进行可视化。

1.7 表达谱分析

从苹果多维组学数据库 (AppleMDO) 中获取 6 个 *MdPEPC* 基因的表达谱^[18]。其中包括组织/器官和不同发育阶段 (中央种子、侧种子、茎、叶、花、花瓣、柱头、花柱、子房、花药、花丝、萼片、花托、花粉、4 个休眠芽期、破蕾期、14 个果实发育阶段) 共 36 个, 从盛开后 1 周到收获、成熟果皮和果肉在数据库中, 所有 RNA-seq 数据都已得到质量控制, 并且可以从数据库中提取每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM 值)。表达热图由 TBtools 软件绘制。

1.8 转录组数据处理及分析作图

转录组测序后, 调取苹果 *MdPEPC* 基因相关的表达量数据, 在 Excel 中对其进行处理与整理。利用 TBtools 对数据进行标准化并绘制热图。

2 结果与分析

2.1 苹果 *MdPEPC* 基因家族成员鉴定及蛋白理化性质分析

在苹果全基因组 (GDDH13.1-1) 中鉴定出

6 个 *MdPEPC* 家族成员, 根据其在染色体的位置依次命名为 *MdPEPC1*–*MdPEPC6*, 并对其进行理化性质分析 (表 1)。*MdPEPC* 家族成员的氨基酸序列长度为 967–1 041 aa。等电点范围为 5.97–6.51, 均小于 7, 表明该家族成员为酸性蛋白。相对分子质量在 110.225–117.261 kDa 之间。所有成员的不稳定系数均大于 45, 表明其为不稳定蛋白, 且平均亲水系数均小于 0。亚细胞预测其均定位于细胞质。

2.2 苹果 *MdPEPC* 基因的染色体定位

苹果中 6 个 *MdPEPC* 基因分布于 6 条染色体上, 染色体号为 Chr03、Chr09、Chr11、Chr13、Chr16 和 Chr17 (图 1)。

2.3 苹果 *MdPEPC* 系统进化树及序列比对分析

为了探索苹果 *MdPEPC* 家族的系统进化关系, 将苹果和拟南芥的 PEPC 家族蛋白序列共同构建进化树 (图 2A), 以及 N 端和 C 端的序列进行比对分析 (图 2B)。结果表明, 苹果 *MdPEPC* 家族成员分为两大亚类 (Group I 和 Group II), 其中苹果 *MdPEPC1*–3、*MdPEPC6* 和拟南芥 *AtPPC1*–3 的 N 末端都含有植物磷酸化结构域, C 末端为高度保守的 QNTG 残基, 具有植物型 PEPC 的特征, 聚为 I 组, 属于植物类 PEPC; 而 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 的 N 末端不存在磷酸化结构域, 并且 C 末端由一些细菌所含有的 RNTG 序列组成, 属于细菌类 PEPC, 与拟南芥 *AtPPC4* 聚为 II 组。

2.4 苹果 *MdPEPC* 蛋白保守基序分析

对苹果 *MdPEPC* 蛋白的保守结构域分析表明, 两个亚组中 *MdPEPC* 蛋白保守基序的顺序一致, 均按照 motif 9–motif 5–motif 3–motif 10–motif 4–motif 8–motif 2–motif 6–motif 1–motif 7 的顺序排列, 且处于同组中各成员的保守基序位置相似 (图 3)。

表 1 苹果 *MdPEPC* 基因家族成员的鉴定Table 1 Identification of *MdPEPC* gene family in apple

Gene ID	Gene name	Amino acid (aa)	pI	Molecular mass (kDa)	Instability index	Average hydrophilic coefficient	Subcellular localization
MD03G1242000	<i>MdPEPC1</i>	967	6.00	110.304	47.91	-0.379	Cytoplasm
MD09G1237900	<i>MdPEPC2</i>	967	6.05	110.536	45.27	-0.416	Cytoplasm
MD11G1261900	<i>MdPEPC3</i>	968	6.00	110.608	47.30	-0.382	Cytoplasm
MD13G1049200	<i>MdPEPC4</i>	1 041	6.51	117.261	52.76	-0.433	Cytoplasm
MD16G1050300	<i>MdPEPC5</i>	1 041	6.46	117.246	54.32	-0.450	Cytoplasm
MD17G1230800	<i>MdPEPC6</i>	967	5.97	110.225	45.78	-0.392	Cytoplasm

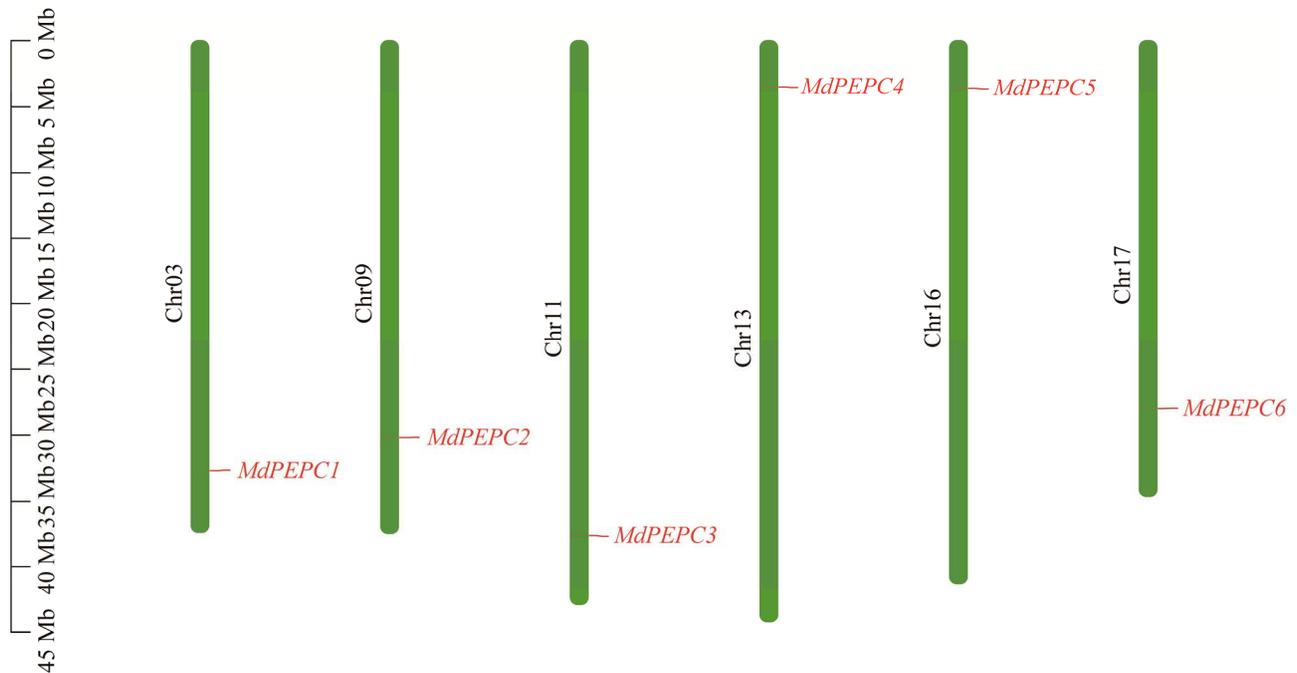
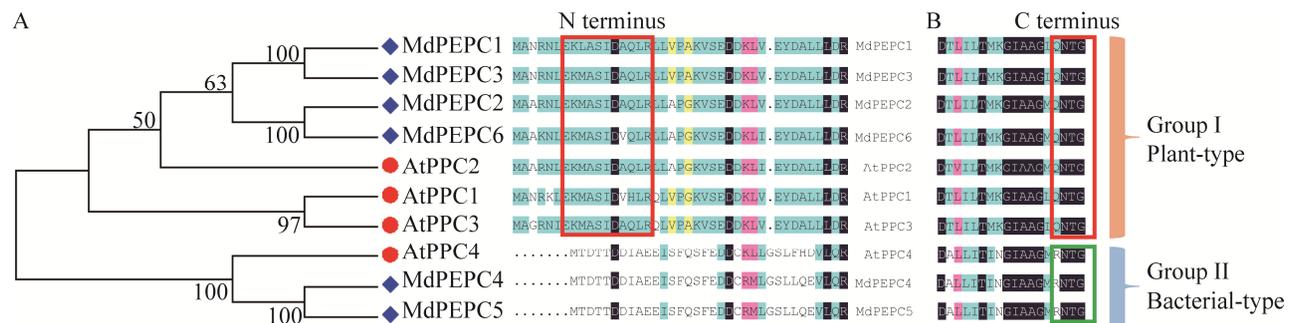
图 1 苹果 *MdPEPC* 家族成员的染色体分布Figure 1 Chromosome distribution of *MdPEPC* family in apple.

图 2 苹果和拟南芥 PEPC 家族系统进化树和序列比对分析

Figure 2 Phylogenetic tree and sequences alignment of PEPC family members in apple and *Arabidopsis*. (A) Phylogenetic tree of the PEPC in apple and *Arabidopsis*. (B) Sequences alignment of the N terminus and C terminus of PEPC family.

2.5 苹果 *MdPEPC* 基因结构分析

对苹果 *MdPEPC* 家族成员基因结构分析表明, 处于II组中的 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 基因结构相似, 且外显子数量均为 20 个, 剩余处于 I 组的 4 个 *MdPEPC* 基因的外显子个数分别为 10 个或 11 个 (图 4)。

2.6 苹果 *MdPEPC* 基因共线性分析

片段重复和串联重复是基因复制的重要来源。苹果 *MdPEPC* 线性分析结果显示, 该家族成员中不存在串联重复基因对。相反地, 片段重复则是同源基因分布于不同染色体上, 共鉴

定出 7 对片段重复 (*MdPEPC1/MdPEPC2*, *MdPEPC1/MdPEPC3*, *MdPEPC1/MdPEPC6*, *MdPEPC2/MdPEPC3*, *MdPEPC2/MdPEPC6*, *MdPEPC3/MdPEPC6*, *MdPEPC4/MdPEPC5*), 其中 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 与苹果 4 个植物型 *PEPC* 均不存在片段重复 (图 5)。

2.7 苹果 *MdPEPC* 基因启动子顺式作用元件分析

为研究 *MdPEPC* 基因对各种反应的应答作用, 本研究对其上游 2 000 bp 启动子序列中的顺式作用元件进行预测 (图 6)。结果显示, *MdPEPC* 基因的顺式作用元件数量在 11 (*MdPEPC6*)—

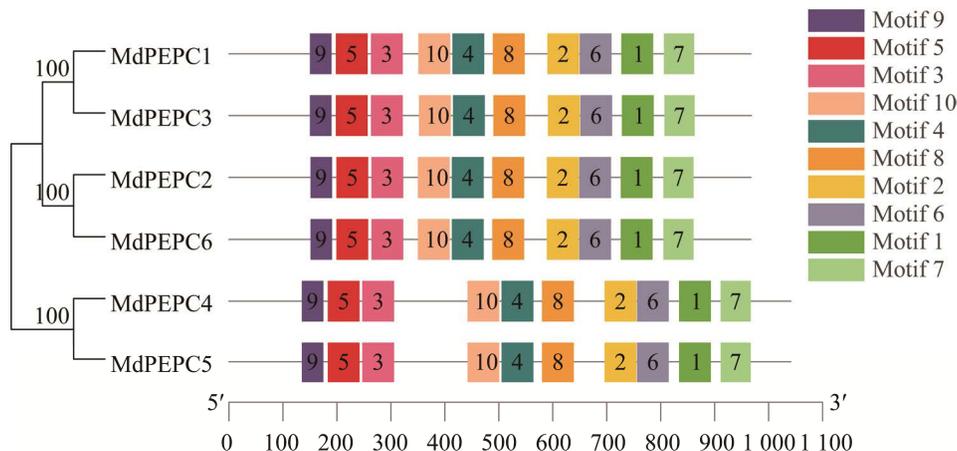


图 3 苹果 *MdPEPC* 蛋白保守基序分析

Figure 3 Conserved motifs of *MdPEPC* proteins in apple.

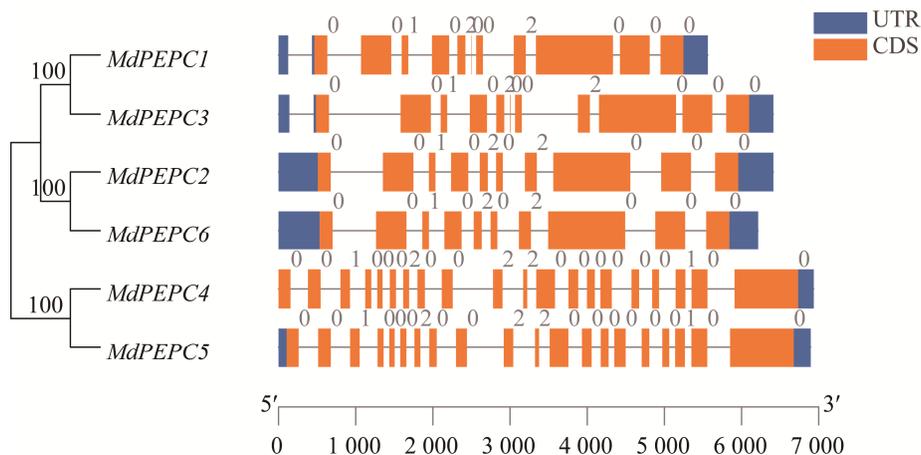


图 4 苹果 *MdPEPC* 基因结构

Figure 4 The gene structure of *MdPEPC* in apple.

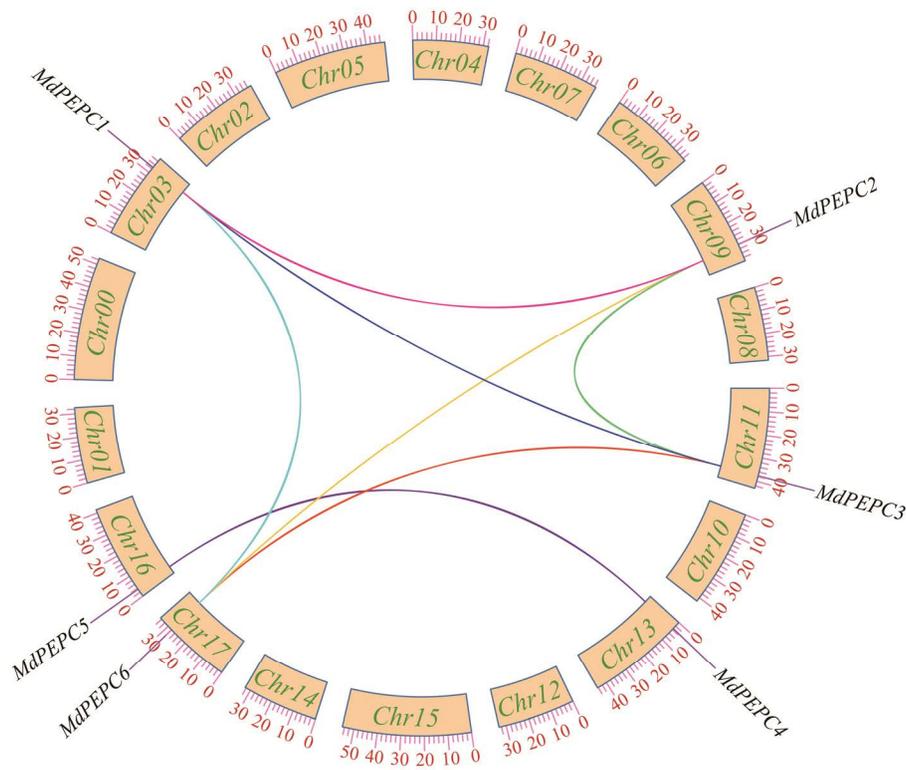


图 5 苹果 *MdPEPC* 基因共线性分析

Figure 5 Gene collinearity analysis of *MdPEPC* genes in apple.

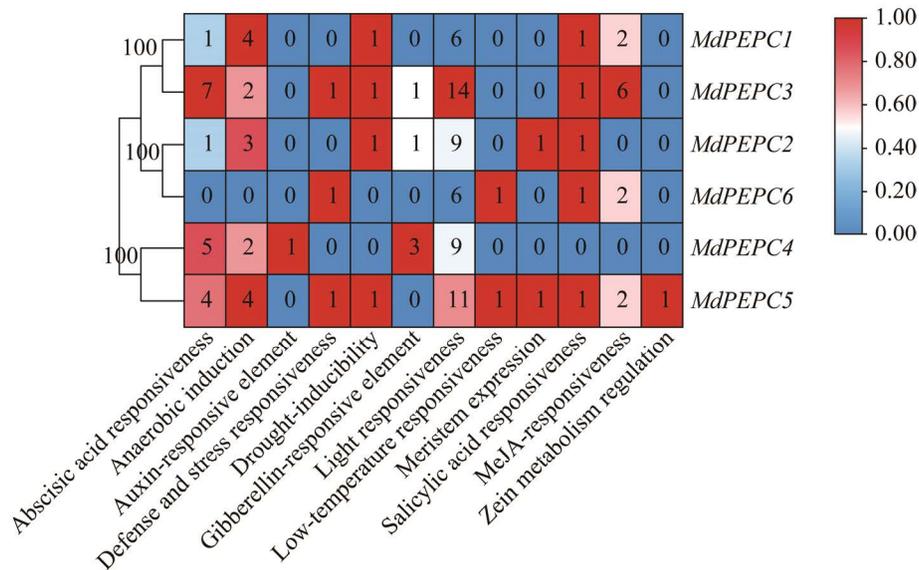


图 6 苹果 *MdPEPC* 基因启动子顺式作用元件分析

Figure 6 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter regions of *MdPEPC* genes. Different numbers in the boxes of the heatmap represent the number of *cis*-elements.

33 (*MdPEPC3*) 之间。其中,与光信号 (light) 相关的响应元件最多,为 55 个;激素相关的响应元件共 41 个,其中包含生长素 (auxin)、脱落酸 (abscisic acid)、赤霉素 (gibberellin)、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 等,此外还包含一些逆境响应元件,如干旱 (drought-inducibility)、低温 (low-temperature) 等 (图 6),表明 *MdPEPC* 基因家族成员不仅受到光、温度等外界环境的影响,还受多种激素调控,从而参与植物体内各类生命活动从而影响苹果的生长发育。

2.8 苹果 *MdPEPC* 基因在不同组织器官和发育阶段的表达模式分析

为分析苹果 *MdPEPC* 基因在不同组织/器官和发育阶段中的表达模式,从 Apple 多维组学数据库 (AppleMDO) 中获得了该家族成员的表达谱 (图 7)。在所有表达谱中,每百万千碱基片段数值 (FPKM) 小于 1 的 *MdPEPC* 基因被认为几乎不表达^[19],因此 6 个 *MdPEPC* 基因并没有在所有组织/器官中表达。如图 7 所示,*MdPEPC1* 在果实生长成熟过程中表达量逐渐降低,在成熟果肉中表达量较低。*MdPEPC2* 的

表达模式则与 *MdPEPC1* 相反,其在果实生长成熟过程中逐渐升高,在成熟果肉中表达量较高。*MdPEPC3* 在检测的组织器官中均有表达,且在花器官中表达量相对较高。*MdPEPC6* 在除花粉 (pollen) 外的其他组织/器官中均有较高表达。此外,位于 II 组中的 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 除在个别组织/器官中有表达外,在其他组织/器官中表达量均较低,且除 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 外,其他基因均在不同时期芽中有表达。

2.9 苹果 *MdPEPC* 基因在腋芽萌发中的表达分析

为后期进一步探索苹果 *MdPEPC* 基因在腋芽萌发中的作用,从去顶和 TDZ 处理后的苹果腋芽转录组中对该家族成员在不同处理时期的表达量进行筛选和分析 (图 8)。结果显示,*MdPEPC1* 和 *MdPEPC3* 基因在去顶后不同时期上调表达,且在 TDZ 处理后 48 h 明显上调表达;*MdPEPC2* 基因在去顶和 TDZ 处理后 48 h 明显下调表达,表明其可能参与调控苹果腋芽萌发。

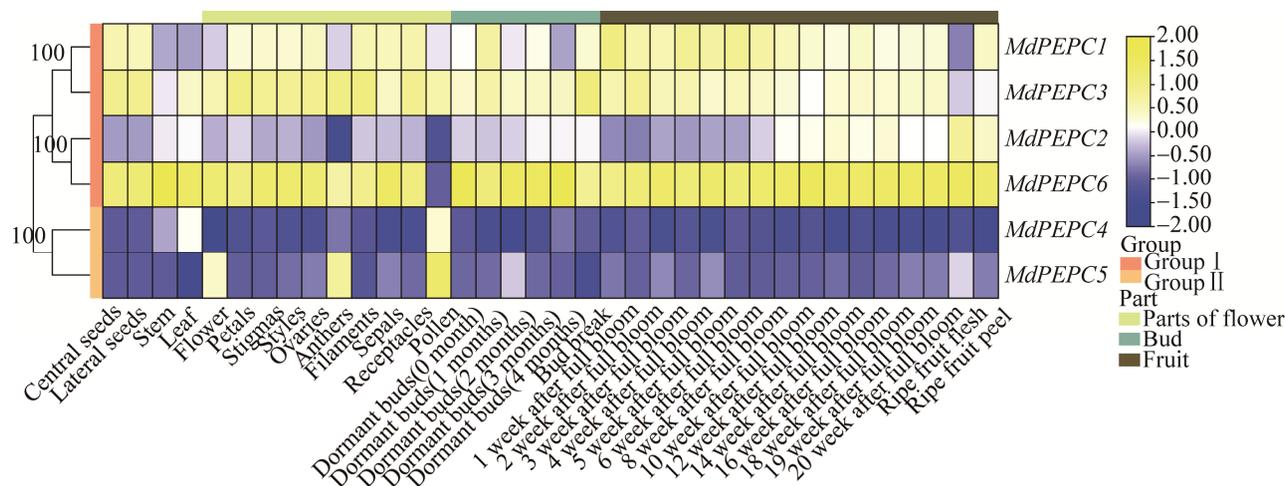


图 7 苹果 *MdPEPC* 在不同组织/器官和发育阶段的表达模式热图

Figure 7 Heatmap of the expression pattern of *MdPEPC* genes in various tissues/organs and developmental stages.

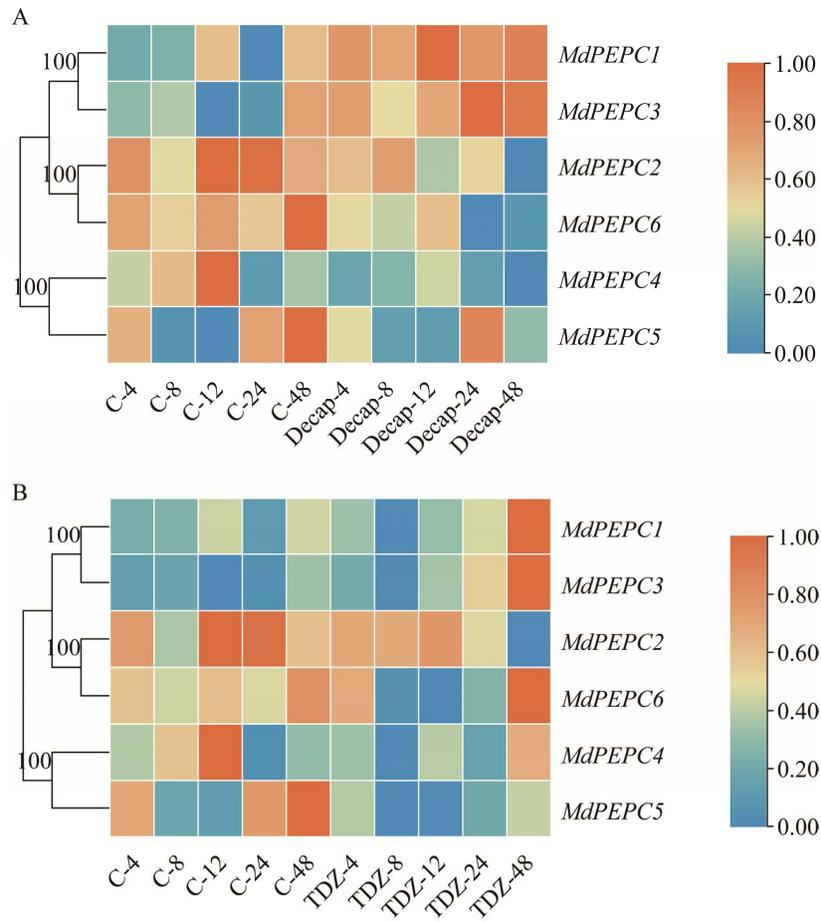


图 8 苹果 *MdPEPC* 在去顶 (A) 和 TDZ (B) 处理后腋芽转录组中的表达水平分析

Figure 8 *MdPEPC* gene expression level in transcriptome data of apple axillary buds after decapitation (A) and TDZ treatments (B). “C”: control; “decap”: decapitation; “4, 8, 12, 24, 48”: indicated time (hours, h) after treatments.

3 讨论

基于苹果全基因组, 本研究共鉴定出 6 个 *MdPEPC* 家族成员。MdPEPC 蛋白的理化性质相对稳定, 亚细胞定位预测均位于细胞质中, 与前人在杨梅、木薯等的研究结果相似^[11,20]。将苹果和拟南芥的 PEPC 蛋白共同构建系统发育树, 并对其保守性进行分析, 结果显示 PEPC 分为 Group I 和 Group II 两个亚族 (图 2)。据报道, PEPC 分为植物型 (PTPC) 与细菌型 (BTPC) 两种类型, 其最显著的区别在于植物型的

N 端存在一个丝氨酸残基, 而细菌型不存在^[21-22], 且丝氨酸残基处可发生可逆磷酸化^[23]。可逆磷酸化是 C4 和景天酸代谢 (crassulacean acid metabolism, CAM) 光合作用中初级碳固定的关键调节机制^[24]。拟南芥 PEPC 家族成员 AtPPC1、AtPPC2 和 AtPPC3 为植物型 (PTPC), 且都聚类在 I 组, AtPPC4 为细菌型 (BTPC), 聚类在 II 组^[10], 因此我们推测聚类在 I 组中的苹果 *MdPEPC* 家族成员属于植物型 PEPC, 聚类在 II 组中的 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 则为细菌型 PEPC。保守基序分析发现所有 *MdPEPC* 蛋白预

测的 10 个保守基序顺序和位置基本一致,但亚组之间略有差异,这可能是形成结构域差异的主要原因之一。顺式作用元件调控基因的表达^[25],预测发现 *MdPEPC* 家族成员的顺式作用元件主要有光响应元件,这可能与其参与光合作途径有关;其次含有多种激素响应元件,如生长素、脱落酸以及赤霉素等与分枝相关的激素作用元件^[26],表明其可能响应相关激素参与苹果分枝发育。近些年来,一些研究也表明 *PEPC* 基因家族参与非生物胁迫反应^[27-29]。

PEPC 基因在植物组织中表达具有特异性。例如木薯 *MePEPC1* 在功能叶中表达最高,*MePEPC5* 在花中有较高表达^[20],菠萝 *AcPEPC1* 在叶片中的表达量较高,在根和花中的表达较低,*AcPEPC3* 同样呈现相反的趋势^[30],杧果 *MiPEPC2* 在种子中的表达量相对较高,*MiPEPC3* 在花穗、果皮和果肉有较高表达^[9],榴莲 *DzPEPC2* 在茎中高表达,*DzPEPC4* 和 *DzPEPC5* 在果肉中有较高表达^[31],橡胶树 *HbPPC1* 在叶片具有较高表达量,*HbPPC2* 在树皮、雄花、雌花也有较高的表达量^[32]。据报道,*PEPC* 基因在柑橘果实成熟过程中起到两个重要作用:早期柠檬酸的合成和最后阶段或收获后 NADH 的再氧化^[7]。在成熟香蕉中 *PEPC* 的整体活性与 NH_4^+ 同化和转氨反应所需的碳骨架的生成紧密平衡^[33]。在番茄果实发育中,*PEPC* 基因主要功能为合成有机酸,作为液泡中积累的钾离子的反离子,从而允许果实在快速生长阶段发生细胞增大,在葡萄果实发育中 *PEPC* 也参与调节有机酸和糖水平^[3-4]。同样,本研究中的表达谱分析发现苹果 PTPC 类基因 *MdPEPC1* 在果实生长成熟过程中表达量逐渐降低,*MdPEPC2* 基因则与其表达模式相反(图 7),推测这两个基因可能在果实成熟过程中有作用。此外,与 PTPC 型基因相比,苹果 BTPC

型基因 *MdPEPC4* 和 *MdPEPC5* 在所检测的组织/器官中表达量均相对较低,且 4 个苹果 PTPC 型基因在苹果芽不同时期均有表达(图 7),表明其可能参与分枝发育。

研究发现,去除植物顶芽可降低生长素的合成,从而减少顶端优势,促进侧芽的萌发^[33],TDZ 具有很强的细胞分裂素活性,可直接促进植物腋芽萌发^[34-36]。苹果中,去顶和外源细胞分裂素处理可显著诱导其腋芽萌发^[37],通过对去顶和 TDZ 处理后苹果腋芽转录组数据中苹果 *MdPEPC* 家族成员的表达量筛选和分析发现,*MdPEPC1* 和 *MdPEPC3* 响应去顶处理上调表达,且在 TDZ 处理后 48 h 检测到明显上调表达,表明其可能具有促进腋芽萌发的功能;而 *MdPEPC2* 基因在去顶和 TDZ 处理后 48 h 表达量明显下调,表明其可能在调控腋芽萌发中与 *MdPEPC1* 和 *MdPEPC3* 具有相反作用,但仍需进一步深入地研究进行验证。

目前关于光合作用调控植物分枝发育的研究较少,且相关基因的数量和功能研究深度均不足。本研究通过分析与光合作用相关的 *PEPC* 基因家族成员,鉴定出 6 个苹果 *MdPEPC* 基因,其中 4 个为植物型 *PEPC*,2 个为细菌型 *PEPC*,并对其进行了相关生物信息学分析以及通过调取去顶和 TDZ 处理的苹果腋芽转录组数据筛选出 *MdPEPC1*、*MdPEPC2* 和 *MdPEPC3* 作为调控腋芽萌发的候选基因,为进一步验证 *MdPEPC* 基因在调控苹果侧枝发育中的作用奠定前期基础。

REFERENCES

- [1] O'Leary B, Park J, Plaxton WC. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J*, 2011, 436(1):

- 15-34.
- [2] Izui K, Matsumura H, Furumoto T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55(1): 69-84.
- [3] Guillet C, Just D, Bénard N, et al. A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta*, 2002, 214(5): 717-726.
- [4] Sweetman C, Deluc LG, Cramer GR, et al. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, 2009, 70(11/12): 1329-1344.
- [5] Cousins AB, Baroli I, Badger MR, et al. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C4 photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance. *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 1006-1017.
- [6] Cheng G, Wang L, Lan HY. Cloning of *PEPC-1* from a C4 halophyte *Suaeda aralocaspica* without Kranz anatomy and its recombinant enzymatic activity in responses to abiotic stresses. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 83(11): 57-67.
- [7] Perotti VE, Figueroa CM, Andreo CS, et al. Cloning, expression, purification and physical and kinetic characterization of the phosphoenolpyruvate carboxylase from orange (*Citrus sinensis* osbeck var. *Valencia*) fruit juice sacs. *Plant Sci*, 2010, 179(5): 527-535.
- [8] Østergaard L, Kempin SA, Bies D, et al. Pod shatter-resistant *Brassica* fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(1): 45-51.
- [9] 彭文丽, 刘照宇, 李晓波, 等. 杧果 PEPC 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *中国南方果树*, 2021, 50(6): 37-46.
Peng WL, Liu ZY, Li XB, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *PEPC* gene family in mango. *South China Fruits*, 2021, 50(6): 37-46 (in Chinese).
- [10] Sánchez R, Cejudo FJ. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 949-957.
- [11] 杨成超, 王红, 朱建军, 等. 杨梅 *PEPC* 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *分子植物育种*, 2022: 1-9. (2022-04-26). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220425.1517.018.html>.
Yang CC, Wang H, Zhu JJ, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *PEPC* gene family in waxberry (*Myrica rubra* L.). *Mol Plant Breed*, 2022: 1-9. (2022-04-26). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220425.1517.018.html> (in Chinese).
- [12] 门小鹏, 许雪峰, 王玉斌, 等. 我国苹果生产的现状、问题与发展对策. *农村实用技术*, 2022(1): 25-27+59.
Men XP, Xu XF, Wang YB, et al. The present situation, problems and development countermeasures of apple production in our country. *Rural Practical Technology*, 2022(1): 25-27, 59. (in Chinese).
- [13] Kim HK, Van Oosterom E, Dingkuhn M, et al. Regulation of tillering in *Sorghum*: environmental effects. *Ann Bot*, 2010, 106(1): 57-67.
- [14] Kebrom TH, Mullet JE. Photosynthetic leaf area modulates tiller bud outgrowth in *Sorghum*. *Plant Cell Environ*, 2015, 38(8): 1471-1478.
- [15] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [16] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [17] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325-327.
- [18] Da LL, Liu Y, Yang JT, et al. AppleMDO: a multi-dimensional omics database for apple co-expression networks and chromatin states. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1333.
- [19] Wang R, Zhao P, Kong N, et al. Genome-wide identification and characterization of the potato *bHLH* transcription factor family. *Genes (Basel)*, 2018, 9(1): E54.
- [20] 李相辰, 沈旭, 周新成, 等. 木薯 *PEPC* 基因家族成员鉴定及表达分析. *作物学报*, 2022, 48(12): 3108-3119. (2022-04-19). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20220416.2200.002.html>.
Li XC, Shen X, Zhou XC, et al. Identification and relative expression levels of *PEPC* gene family members in cassava. *Acta Agron Sin*, 2022: 48(12): 3108-3119. (in Chinese).
- [21] Chollet R, Vidal J, O'Leary MH. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 273-298.

- [22] Vidal J, Chollet R. Regulatory phosphorylation of C4 PEP carboxylase. *Trends Plant Sci*, 1997, 2(6): 230-237.
- [23] Hartwell J, Gill A, Nimmo GA, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. *Plant J*, 1999, 20(3): 333-342.
- [24] Nimmo HG. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(2): 75-80.
- [25] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 88-94.
- [26] Rameau C, Bertheloot J, Leduc N, et al. Multiple pathways regulate shoot branching. *Front Plant Sci*, 2015, 5: 741.
- [27] Carmo-Silva AE, Bernardes Da Silva A, Keys AJ, et al. The activities of PEP carboxylase and the C₄ acid decarboxylases are little changed by drought stress in three C₄ grasses of different subtypes. *Photosynth Res*, 2008, 97(3): 223-233.
- [28] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, et al. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing *PEPC* gene cloned from maize. *Plant Sci*, 2007, 172(6): 1204-1209.
- [29] Sánchez R, Flores A, Cejudo FJ. *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 2006, 223(5): 901-909.
- [30] 马海洋, 赵秋芳, 陈曙, 等. 菠萝 *PEPC* 基因家族生物信息学分析. *热带作物学报*, 2020, 41(1): 97-103. Ma HY, Zhao QF, Chen S, et al. Bioinformatics analysis of *PEPC* gene family in pineapple. *Chin J Trop Crops*, 2020, 41(1): 97-103 (in Chinese).
- [31] 彭文丽, 杨成坤, 崔志富, 等. 榴莲 *PEPC* 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *分子植物育种*, 2022, 20(1): 76-85. Peng WL, Yang CK, Cui ZF, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *PEPC* gene family in durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Mol Plant Breed*, 2022, 20(1): 76-85 (in Chinese).
- [32] 王岳坤, 阳江华, 丁丽, 等. 橡胶树 *PEPC* 基因的克隆、生物信息学和表达分析. *西南农业学报*, 2017, 30(11): 2436-2443. Wang YK, Yang JH, Ding L, et al. Cloning, bio-informatics and expression analysis of *PEPC* gene from *Hevea brasiliensis*. *Southwest China J Agric Sci*, 2017, 30(11): 2436-2443 (in Chinese).
- [33] Law RD, Plaxton WC. Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. *Biochem J*, 1995, 307(3): 807-816.
- [34] 高凯, 朱铁霞, 邓波, 等. 顶端优势去除对菊芋物质分配规律的影响. *中国草地学报*, 2016, 38(1): 14-19. Gao K, Zhu TX, Deng B, et al. The influence of removal of apical dominance on matter allocation in *Jerusalem artichoke*. *Chin J Grassland*, 2016, 38(1): 14-19 (in Chinese).
- [35] 武慧, 吕杰, 付智坤, 等. TDZ对微型月季不定芽生长的影响. *湖北农业科学*, 2013, 52(13): 3178-3179, 3202. Wu H, Lv J, Fu ZK, et al. Effect of TDZ on adventitious bud growth of *Rosa chinensis minima*. *Hubei Agric Sci*, 2013, 52(13): 3178-3179, 3202 (in Chinese).
- [36] 王洪霞, 郭尚敬. TDZ对甜椒不定芽分化的影响. *北方园艺*, 2012(3): 104-106. Wang HX, Guo SJ. Effect of TDZ on adventitious bud differentiation of sweet pepper. *North Hortic*, 2012(3): 104-106 (in Chinese).
- [37] 孙洪雁, 陶吉寒, 辛力, 等. TDZ和BA对金花梨和鸭梨叶片不定芽再生的影响. *山东农业科学*, 2016, 48(1): 26-28, 39. Sun HY, Tao JH, Xin L, et al. Effects of TDZ and BA on adventitious bud regeneration from leaf explants of pear cultivars Jinhua and yali. *Shandong Agric Sci*, 2016, 48(1): 26-28, 39 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)