

苹果 *PDHB-1* 基因家族的鉴定与表达分析

杨菁华, 高举, 李文芳*, 刘骥, 霍嘉兴, 任振硕, 李龙, 陈佰鸿, 毛娟, 马宗桓

甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070

杨菁华, 高举, 李文芳, 刘骥, 霍嘉兴, 任振硕, 李龙, 陈佰鸿, 毛娟, 马宗桓. 苹果 *PDHB-1* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4965-4981.

YANG Jinghua, GAO Ju, LI Wenfang, LIU Ji, HUO Jiaxing, REN Zhenshuo, LI Long, CHEN Baihong, MAO Juan, MA Zonghuan. Identification and expression analysis of apple *PDHB-1* gene family[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4965-4981.

摘要: 丙酮酸脱氢酶 E1 组分 β 亚基-1 (pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-1, *PDHB-1*) 基因是编码丙酮酸脱氢酶复合物 E1 酶 β 亚基的基因, 在果实酸度积累过程中具有重要作用。为了探究苹果 (*Malus domestica* L.) *PDHB-1* 家族的进化特征及其在不同酸含量苹果中的表达情况, 本研究利用 NCBI、Pfam 等数据库和 ClustalX、MEGA、TBtools 等软件进行生物信息学分析, 通过结合可滴定酸含量测定与实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析, 获得该家族基因在‘艾斯达’和‘成纪 1 号’ 2 个不同酸含量的苹果中的表达情况。*PDHB-1* 家族主要定位于叶绿体、细胞质和线粒体中, α -螺旋和不规则卷曲是该家族二级结构形成的主要因素。组织特异性表达谱显示大部分成员的表达量在果实中高于其他组织。qRT-PCR 结果表明, 大部分成员其表达量变化趋势与可滴定酸含量变化趋势一致, 在果皮中, 有 14 个成员的表达水平在酸含量较高的‘艾斯达’苹果中显著高于酸含量较低的‘成纪 1 号’, 其中 *MdPDHB1-15* 差异最显著; 在果肉中, 17 个成员的表达水平在‘艾斯达’苹果中显著高于‘成纪 1 号’, *MdPDHB1-01* 表达量最高。预测苹果 *PDHB-1* 基因家族在苹果果实酸度积累过程中有重要调控作用。

关键词: 苹果; *PDHB-1* 基因家族; 生物信息学分析; 实时荧光定量 PCR

资助项目: 甘肃省大学生创新创业训练计划项目(S202210733008); 甘肃省科技计划项目(21JR7RA845); 甘肃省科技重大专项(22ZD6NA045)

This work was supported by the Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates in Gansu Province (S202210733008), the Program of Science and Technology in Gansu Province (21JR7RA845), and the Key Science and Technology Project of Gansu Province (22ZD6NA045).

*Corresponding author. E-mail: liwenf@gsau.edu.cn

Received: 2023-01-06; Accepted: 2023-05-23; Published online: 2023-05-27

Identification and expression analysis of apple *PDHB-1* gene family

YANG Jinghua, GAO Ju, LI Wenfang*, LIU Ji, HUO Jiaying, REN Zhenshuo, LI Long, CHEN Baihong, MAO Juan, MA Zonghuan

College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-1 (*PDHB-1*) is a gene encoding the β -subunit of pyruvate dehydrogenase complex, which plays an important role in fruit acid accumulation. The aim of this study was to investigate the evolution characteristics of apple *PDHB-1* family and its expression in apples with different acid contents. Bioinformatics analysis was performed using databases including NCBI, Pfam and software including ClustalX, MEGA, and TBtools. By combining titratable acid content determination and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), the expression of this family genes in the peel and pulp of apple 'Asda' and 'Chengji No.1' with different acid content were obtained, respectively. The family members were mainly located in chloroplast, cytoplasm and mitochondria. α -helix and random coil were the main factors for the formation of secondary structure in this family. Tissue-specific expression profiles showed that the expression of most members were higher in fruit than in other tissues. qRT-PCR results showed that the expression profile of most members was consistent with the profile of titratable acid contents. In the peel, the expression levels of 14 members in 'Asda' apples with high acid content were significantly higher than that in 'Chengji No.1' apples with low acid content, where the expression difference of *MdPDHB1-15* was the most significant. In the pulp, the expression levels of 17 members in 'Asda' apples were significantly higher than that in 'Chengji No.1' apples, where *MdPDHB1-01* was the most highly expressed. It was predicted that *PDHB-1* gene family in apple plays an important role in the regulation of fruit acidity.

Keywords: apple; *PDHB-1* gene family; bioinformatics analysis; quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

苹果是我国北方地区种植规模最大的水果之一，是人们获取维生素、微量元素等的常见来源，其抗氧化以及预防疾病的功能使得苹果受到消费者的青睐^[1]。其中酸度往往是构成苹果果实品质的重要因素之一，酸度不仅仅影响果实的风味还影响其最终加工效果。之前的研究显示，苹果酸在苹果果实有机酸中含量最高，对果实酸度起着重要作用，直接决定着果实风味^[2]。苹果果实酸度变化主要取决于苹果酸的

含量变化，苹果酸的积累是一个包含合成、代谢、转运的复杂过程，与糖酵解、三羧酸循环和乙醛酸循环等过程息息相关^[3]。在三羧酸循环中，苹果酸脱氢酶和苹果酸酶可以氧化苹果酸生成草酰乙酸和丙酮酸。在植物中，丙酮酸脱氢酶复合物同时存在于线粒体和叶绿体中^[4]。在线粒体中丙酮酸脱氢酶复合物可催化丙酮酸不可逆地转化成乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)，以此实现三羧酸循环的循环功能并为线粒体三羧酸

循环提供碳骨架,起着连接糖酵解与三羧酸循环和氧化磷酸化的作用^[5]。因此,丙酮酸脱氢酶在苹果酸积累中可能起着重要作用,间接影响苹果果实酸度的变化。

关于果实中苹果酸合成、代谢及转运的基因研究已取得很多重要的进展,证实大量基因在果实的酸度调控中起着重要作用。例如,*MdPH1* 基因的表达量与沧江海棠果实发育过程中苹果酸含量有高度一致性^[6]; *PpNADP-ME1* 对桃果实中苹果酸分解起主要作用, *PpPEPCK1* 和 *PpPEPCK2* 对桃果实的苹果酸积累调控起辅助作用^[7]; *FaMYB73* 主要调控了草莓果实中苹果酸的合成^[8]; *MdALMT9* 对苹果果实中苹果酸的转运起调控作用, *MdERF017* 和 *MdERF017-like* 调控包括 *MdALMT9* 在内的一系列苹果酸转运及代谢基因的表达促进苹果酸的积累^[9],而在李果实中, *PsALMT9*、*PstDT* 等多种膜蛋白基因协同调控苹果酸跨液泡膜转运过程^[10]; *FaSSADH* 和 *FaSDH2-2* 对草莓果实中的有机酸合成起负调控作用^[11]; *MtPEPP* 调控‘王林’苹果果肉愈伤组织苹果酸合成^[12]。

目前,涉及园艺植物领域的 *PDHB-1* 基因家族的鉴定及表达分析缺乏系统性研究,在大量的园艺植物中,该基因家族仍有待鉴定及功能分析。本研究利用分子生物学方法,对苹果 *PDHB-1* 家族基因进行鉴定以及表达分析,对其理化性质、二级结构、基序(motif)序列、共线性和基因结构等进行分析研究,获得苹果 *PDHB-1* 家族在不同酸含量苹果果实中的表达特点,为该家族在园艺植物领域的鉴定和功能验证提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理

使用成熟期酸含量不同的苹果品种‘艾斯

达’和‘成纪 1 号’为研究材料,该材料来自甘肃省静宁县果树果品研究所。按品种在苹果果实赤道位置平均取 6 个 1 g 果肉及果皮样品,将样品迅速放置于液氮中速冻,然后置于-80 °C 冰箱保存,用于可滴定酸含量的测定及 RNA 的提取。

1.2 苹果 *PDHB-1* 家族成员的鉴定

在 NCBI 网络数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索基因名称获得苹果 *PDHB-1* 基因编码序列(coding sequence, CDS)的 FASTA 序列,利用获得的 FASTA 序列在 Pfam 网站(<https://pfam.xfam.org/>)获得该基因的 InterPro 号(IPR005475),利用 InterPro 号在苹果基因库中搜集所有含有 InterPro 号的基因。根据 *PDHB-1* 基因家族所具有的特定结构域(PF02779),去除结构域不完整或者缺失的序列片段。利用登录号在苹果基因组网站(<https://iris.angers.inra.fr/gddh13/>)中下载基因的全长和 CDS 序列,再利用翻译网站(<https://web.expasy.org/translate/>)得到对应的蛋白质序列。

1.3 苹果 *PDHB-1* 家族成员生物信息学分析

利用 ClustalX 和 MEGA 软件进行比对分析,通过邻接法构建 *PDHB-1* 家族系统进化树。利用 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>)在线软件对苹果 *PDHB-1* 基因结构进行分析。利用 MEME 在线软件(<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行 motif 序列分析。利用 Expasy 数据库(<https://web.expasy.org/protparam/>)中的 ProtParam 工具对蛋白质的编码氨基酸的数目、相对分子量、不稳定系数、亲水性和等电点等基本理化性质信息进行分析。利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位分析。利用软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 *PDHB-1* 家族基因蛋白质的二级结构进行在线分析。

1.4 苹果 *PDHB-1* 家族共线性分析

利用共线性分析软件(<http://tools.bat.infspire.org/circoletto/>)对苹果 *PDHB-1* 家族进行种内共线性分析。利用 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载拟南芥和葡萄的基因组和注释文件,通过 MCSanX 方法在 TBtools 计算拟南芥、葡萄和苹果的 *PDHB-1* 家族成员的共线性关系并可视化。

1.5 顺式作用元件分析、品种组织特异性表达分析

通过苹果多维组学数据库 Apple MDO (http://bioinformatics.cau.edu.cn/AppleMDO/gene_detail.php)获得 20 个苹果 *PDHB-1* 家族成员在不同器官及不同时期中的 FPKM 值并做 log (以 10 为底)标准化处理,包括幼苗、发芽、成熟的花、4 个果实发育阶段、未成熟的果肉和成熟的果皮及果肉、成熟的茎和未成熟及成熟的叶,利用 TBtools 绘制表达热图。PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)用于分析苹果 *PDHB-1* 基因家族上游 2 kb 的碱基片段顺式作用元件的分布情况,利用 TBtools 进行可视化。

1.6 苹果可滴定酸含量的测定

采用酸碱滴定中和法^[13]进行测定并计算。

(1) 样品的处理:在苹果果实阴、阳两面的赤道部位准确称取果肉及果皮 1.0 g,置于研钵内充分研磨后用蒸馏水分 3 次将样品转移至试管内,在 85 °C 条件下水浴加热 30 min,期间不断摇动,取出后冷却至室温,用蒸馏水定容至 10 mL 刻度试管内,摇匀后过滤。

(2) 测定:按品种吸取上述等量滤液放入烧杯中,设置 4 个重复,然后加入适量酚酞指示剂,用 NaOH (0.1 mol/L)进行滴定,直至待测液由无色转变为淡红色且 30 s 内不褪色为止,此时记录 NaOH 溶液的用量。计算式如下:

$$\text{可滴定酸含量(\%)} = \frac{V_A \times c \times \text{折算系数}}{V_B \times 1000} \times \frac{V_T}{W} \times 100$$

式中: V_A 代表由消耗的 NaOH 体积量(mL), c 代表 NaOH 的浓度(0.1 mol/L), 苹果折算系数为 134 g/mol, V_T 代表提取液的总体积(mL), V_B 代表测定时提取液体积(mL), 1 000 为换算系数, W 代表样品鲜重(g)。

1.7 苹果 *PDHB-1* 基因家族的实时荧光定量 PCR 分析

利用 RNAplant 植物 RNA 提取试剂[中科瑞泰(北京)生物科技有限公司]提取苹果果实总 RNA 并测定浓度。将苹果 *PDHB-1* 基因家族的 CDS 序列在生工生物工程(上海)股份有限公司进行在线引物设计,并由该公司合成(表 1)。使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒 II (艾科瑞生物科技有限公司)进行反转录获得 cDNA,并用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 试剂盒(艾科瑞生物科技有限公司)进行定量。应用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (LightCycler[®]96 Real-Time PCR System)进行荧光定量 PCR 扩增,以苹果 *GADPH* 为内参。反应体系为: 2 μ L cDNA, 上下游引物各 1 μ L (引物浓度为 0.2 μ mol/L), SYBR Green 10 μ L, ddH₂O 补齐 20 μ L。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对基因相对表达量进行计算。

2 结果与分析

2.1 苹果 *PDHB-1* 家族蛋白理化性质分析和亚细胞定位预测

利用苹果基因组网站(<https://iris.angers.inra.fr/gddh13/>)搜索,共计获得 20 个 *PDHB-1* 家族基因,将这 20 个 *PDHB-1* 基因分别命名为 *MdPDHB1-01-MdPDHB1-20*。由表 2 可知,苹果 *PDHB-1* 家族基因分布在苹果 17 条染色体中的

表 1 苹果 *PDHB-1* 基因家族表达分析的实时荧光定量引物Table 1 qRT-PCR primers for expression analysis of *PDHB-1* in apple

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>MdPDHB1-01</i>	GCGGTCTTCGGCGTATTTCGTTAG	CCAGCAGATGCCTTAACAGAGAGC
<i>MdPDHB1-02</i>	GCCCGACTGGAGCGATTTCTTC	GGAAGTAGTTGGCAGGAGTTGTCAC
<i>MdPDHB1-03</i>	CTTCGTCATCGCCGTCGTCTTC	TCCGTGGTCTTGTCCAGAGTCTC
<i>MdPDHB1-04</i>	AGGAGGGTATTAGACGGCTGGTTC	GCTCTCGCTGGATAAGGTCATACG
<i>MdPDHB1-05</i>	AGTAATCTGGGAAGCACGGTTTGAC	CCATGAGGAAGCAACAACAAGC
<i>MdPDHB1-06</i>	GGGTCGAGTTGGAAGGAGGAG	CGCTTGGTTGATGGCAGAGTAGAG
<i>MdPDHB1-07</i>	TGCCGCAATCACCGAGAACTTC	CTCAACCGCCGTCACAATCTGG
<i>MdPDHB1-08</i>	CATTTCCACCACGGCTCCAAC	GAGGACGGCGATGACGACAAAG
<i>MdPDHB1-09</i>	AGGAGGGTATTAGACGGCTGGTTC	TCTCGCTGGATGAGGTCGTAAGG
<i>MdPDHB1-10</i>	TGAGTGGACAACAGCAAAGAGGTTT	CCGAGATCAGCAGCCCTATCAAAC
<i>MdPDHB1-11</i>	TGTTGTGATGGACCATTCCGTATGC	TGTTGAAAGAAGAGACCGAGCCTTG
<i>MdPDHB1-12</i>	TGCCGCAATCACTGTGAACTTCC	CTCAACCGCCGTCACAATCTGG
<i>MdPDHB1-13</i>	TCCTCTTCTCCTCCTCCTCCAC	CGCTTGGTTGATGGCAGAGTAGAG
<i>MdPDHB1-14</i>	GCTGCTGAGATACTCGTAAGGAAG	CCTTCTTCAACCGTCACCAGTCTG
<i>MdPDHB1-15</i>	GACGGTCCTACGCATTCTGGTTC	GGTCATCTATGGCAGCAGCAGTG
<i>MdPDHB1-16</i>	CAGGCTGCTGAGATACTTGCTAAGG	TCTTTCTTCAACCGTCACCAGTCTG
<i>MdPDHB1-17</i>	TCAATGGTTCAGAAGCTGCCTCAAGG	ATGGTTCGACAAAGCTGCCTAAG
<i>MdPDHB1-18</i>	TCTCCTTACCTACCGCCACTCTTG	CGGAACTGGGTGCTTGCTTGTAG
<i>MdPDHB1-19</i>	GCTAAGGAAGGAATCCGTGCTGAG	ACCAACACCATGCTGAGGAAACC
<i>MdPDHB1-20</i>	GCCTTCTAACATGGTGGTGATGG	GGTCATCTATGGCAGCAGCAGTG
<i>GADPH</i>	TGAGGGCAAGGTGAAGGGTATCTT	TCAAGTCAACCACACGCGTACTGT

11 条上, 其中 2 号、7 号、13 号染色体上分布最多, 各有 3 个基因, 其次是 1 号、15 号、16 号染色体各有 2 个基因, 3 号、5 号、8 号、10 号、11 号染色体上各有 1 个基因。该基因家族编码氨基酸数目主要集中在 182–1 019 aa, *MdPDHB1-05* 氨基酸序列最短, 包含 182 个氨基酸残基, *MdPDHB1-04* 和 *MdPDHB1-02* 氨基酸序列最长, 包含 1 019 个氨基酸残基; 相对分子质量介于 20 370.67 Da (*MdPDHB1-05*)–115 312.43 Da (*MdPDHB1-04*); 等电点(isoelectric point, pI)介于 4.55 (*MdPDHB1-05*)–7.66 (*MdPDHB1-10*), 其中 1 个碱性蛋白(pI>7.5), 12 个酸性蛋白(pI<6.5), 7 个中性蛋白(pI 6.5–7.5); 不稳定指数介于 32.59 (*MdPDHB1-18*)–46.32 (*MdPDHB1-13*); 除

MdPDHB1-06、*MdPDHB1-12*、*MdPDHB1-13*、*MdPDHB1-14*、*MdPDHB1-16* 为亲水性蛋白外, 其余都为不稳定疏水性蛋白; 基因全长介于 928 bp (*MdPDHB1-12*)–4 002 bp (*MdPDHB1-03*); cDNA 全长介于 549 bp (*MdPDHB1-05*)–3 060 bp (*MdPDHB1-04*)。20 个苹果 *PDHB-1* 家族基因主要位于叶绿体、细胞质和线粒体, 其中有 13 个基因主要定位在叶绿体, 6 个基因主要定位于细胞质, 1 个基因(*MdPDHB1-09*)主要定位在线粒体。

2.2 苹果 *PDHB-1* 家族基因的二级结构

苹果 *PDHB-1* 家族基因蛋白质二级结构预测分析结果如图 1 所示, 苹果 *PDHB-1* 家族编码的蛋白质二级结构以 α -螺旋和不规则卷曲为主, β -转角结构最少。其中 α -螺旋结构所占比

表 2 苹果 *PDHB-1* 基因家族理化性质和亚细胞定位分析Table 2 The physicochemical property and subcellular localization analysis of *PDHB-1* gene family in apple

Gene ID	Gene name	Amino acids	Molecular weight (D)	pI	Instability index	Hydrophilic	Full length genomic (bp)	LF-cDNA (bp)	Chromosome location	Subcellular localization
MD01G1041300	<i>MdPDHB1-01</i>	714	76 859.13	7.09	35.79	-0.106	4 171	2 145	1	Chloroplast
MD01G1122800	<i>MdPDHB1-02</i>	1 019	115 191.49	6.58	43.54	-0.429	5 232	3 060	1	Chloroplast
MD02G1207200	<i>MdPDHB1-03</i>	747	80 561.92	6.29	34.53	-0.263	4 002	2 244	2	Chloroplast
MD02G1281300	<i>MdPDHB1-04</i>	1 019	115 312.43	6.58	41.90	-0.454	5 621	3 060	2	Chloroplast
MD02G1281500	<i>MdPDHB1-05</i>	182	20 370.67	4.55	38.09	-0.263	1 209	549	2	Cytoplasm
MD03G1002200	<i>MdPDHB1-06</i>	363	39 632.52	6.41	42.37	0.034	3 093	1 092	3	Chloroplast
MD05G1282600	<i>MdPDHB1-07</i>	406	43 894.37	6.61	35.76	-0.053	2 860	1 221	5	Chloroplast
MD07G1119500	<i>MdPDHB1-08</i>	747	80 488.86	6.22	33.07	-0.243	4 026	2 244	7	Chloroplast
MD07G1192300	<i>MdPDHB1-09</i>	1 011	114 347.50	6.11	38.38	-0.438	5 916	3 036	7	Mitochondria
MD07G1192400	<i>MdPDHB1-10</i>	519	58 767.00	7.66	32.75	-0.292	1 798	1 560	7	Cytoplasm
MD08G1142600	<i>MdPDHB1-11</i>	715	78 214.61	6.06	40.79	-0.041	5 042	2 148	8	Cytoplasm
MD10G1260900	<i>MdPDHB1-12</i>	263	28 739.20	5.47	33.42	0.054	928	792	10	Cytoplasm
MD11G1002200	<i>MdPDHB1-13</i>	369	40 135.96	7.04	46.32	0.003	3 293	1 110	11	Chloroplast
MD13G1125300	<i>MdPDHB1-14</i>	373	39 846.56	5.49	39.49	0.018	4 787	1 122	13	Chloroplast
MD13G1175400	<i>MdPDHB1-15</i>	692	74 136.60	6.52	42.08	-0.05	4 090	2 079	13	Chloroplast
MD13G1216400	<i>MdPDHB1-16</i>	288	30 981.62	6.20	36.14	0.021	1 001	867	13	Cytoplasm
MD15G1119100	<i>MdPDHB1-17</i>	715	77 954.25	6.11	42.17	-0.047	5 078	2 148	15	Cytoplasm
MD15G1309900	<i>MdPDHB1-18</i>	713	76 566.72	6.91	32.59	-0.094	3 726	2 142	15	Chloroplast
MD16G1126100	<i>MdPDHB1-19</i>	373	39 984.80	5.83	35.68	-0.013	4 966	1 122	16	Chloroplast
MD16G1177200	<i>MdPDHB1-20</i>	692	73 963.44	6.41	39.35	-0.064	4 347	2 079	16	Chloroplast

例介于 34.07%–47.72%，在 *MdPDHB1-05* 中所占比例最小，*MdPDHB1-14* 和 *MdPDHB1-19* 中所占比例最大；不规则卷曲结构所占比例介于 32.71%–44.7%，在 *MdPDHB1-19* 中所占比例最小，*MdPDHB1-10* 中所占比例最大； β -转角所占比例介于 4.62%–8.17%，在 *MdPDHB1-10* 中所占比例最小，*MdPDHB1-03* 中所占比例最大。根据上述分析，可得出 α -螺旋和不规则卷曲是苹果 *PDHB-1* 家族螺旋结构形成的主要因素。

2.3 苹果 *PDHB-1* 家族进化及基因结构分析

使用苹果、葡萄、烟草和梨 *PDHB-1* 基因家族蛋白质序列在 ClustalX 和 MEGA 软件上构建 *PDHB-1* 家族系统进化树(图 2)，并将该家族分为 3 个亚族 Class I、Class II、Class III。苹果

PDHB-1 基因家族主要集中在 Class II、Class III 两个亚族上，其中 *MdPDHB1-19* 和 *PbPDHB1-29*，*MdPDHB1-14*、*MdPDHB1-16* 和 *PbPDHB1-30* 在同一分支上，距离最近，同源性较高。

利用 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>) 在线软件获得苹果 *PDHB-1* 家族基因结构图(图 3)，发现不同分支的成员基因结构存在差异。由图可知，*MdPDHB1-10*、*MdPDHB1-12*、*MdPDHB1-16* 整条基因无上下游结构，且 *MdPDHB1-12* 和 *MdPDHB1-16* 在 Class I 亚族，*MdPDHB1-10* 在 Class II 亚族，*MdPDHB1-05* 不含有上游结构，其他成员基因结构完整。该基因家族外显子数目分布在 3–14 之间，内含子数

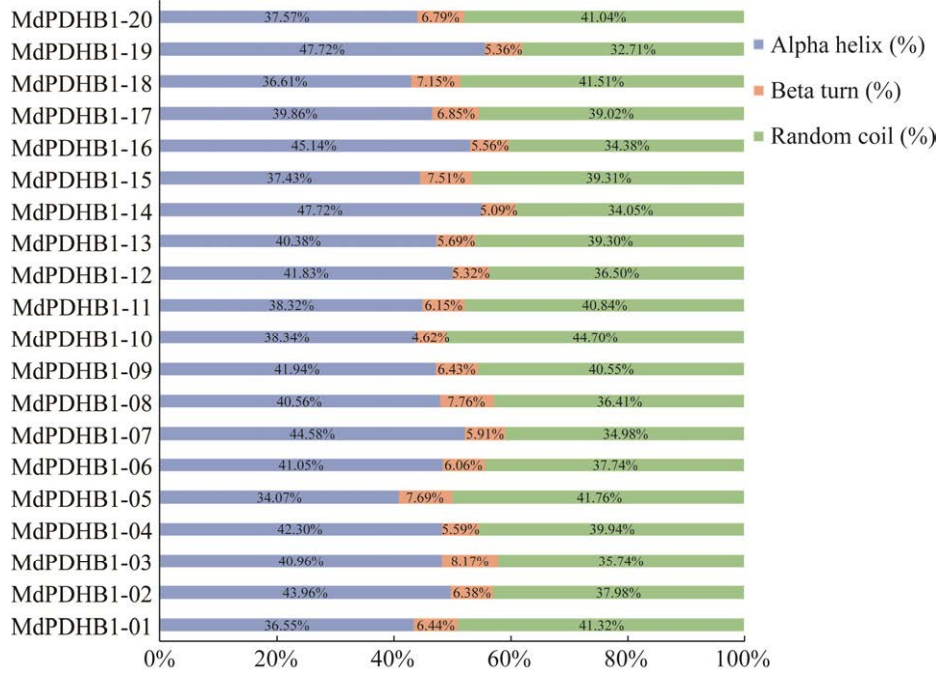


图 1 苹果 PDHB-1 家族基因二级结构
Figure 1 Secondary structure of apple PDHB-1 family genes.

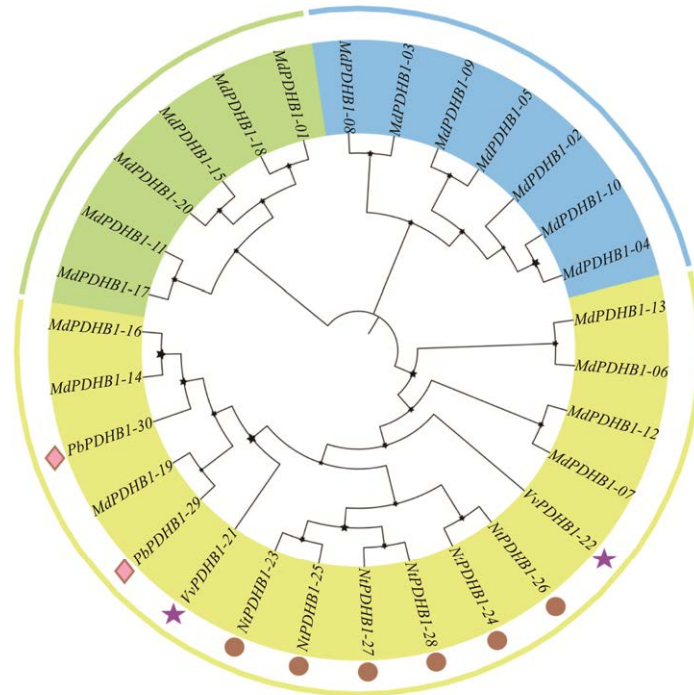


图 2 苹果 PDHB-1 家族候选基因进化树 苹果 Md: *Malus domestica* L.; 欧洲葡萄 Vv: *Vitis vinifera* L.; 烟草 Nt: *Nicotiana tabacum* L.; 白梨 Pb: *Pyrus x bretschneideri* L.
Figure 2 The phylogenetic tree for apple PDHB-1 family candidate genes. Md: *Malus domestica* L.; Vv: *Vitis vinifera* L.; Nt: *Nicotiana tabacum* L.; Pb: *Pyrus x bretschneideri* L..

分布在2-13之间，其中Class III中的聚类成员基因结构较为相似，均含有10个外显子以及9个内含子，长度均大于3 kb，推测这些基因在功能上有一定的相似性。

2.4 苹果 *PDHB-1* 家族 motif 序列分析

利用MEME在线软件对苹果 *PDHB-1* 家族20个成员进行保守特征结构域分析，设置8个保守基序(图4，表3)。基序氨基酸数分布在

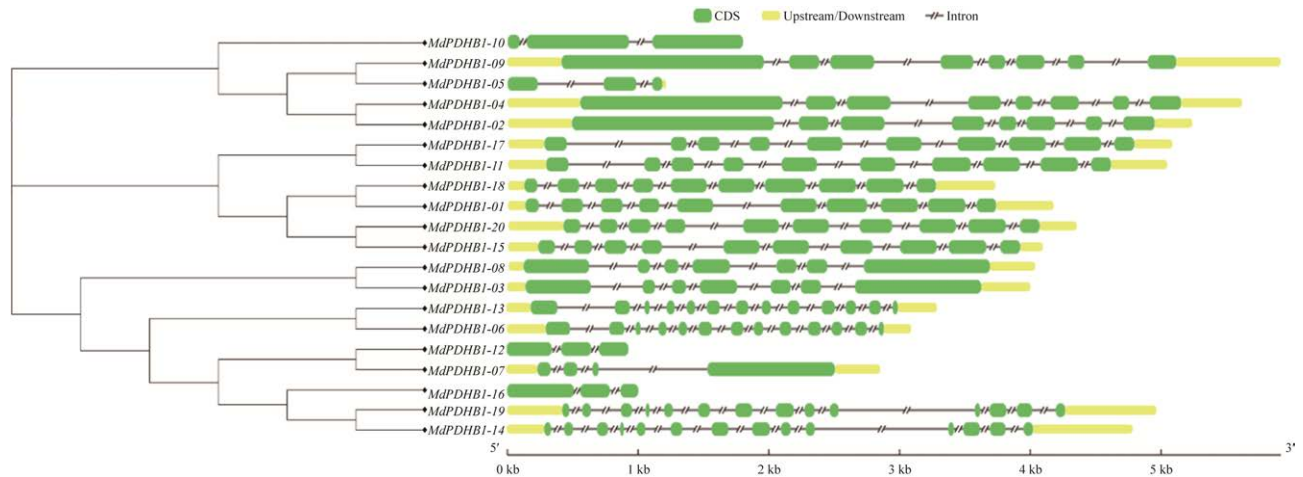


图3 苹果 *PDHB-1* 基因家族基因结构

Figure 3 The structure of *PDHB-1* gene family in apple. The green parts indicate exons; Yellow parts indicate untranslated 5'- and 3'-regions; Slash parts indicate introns.

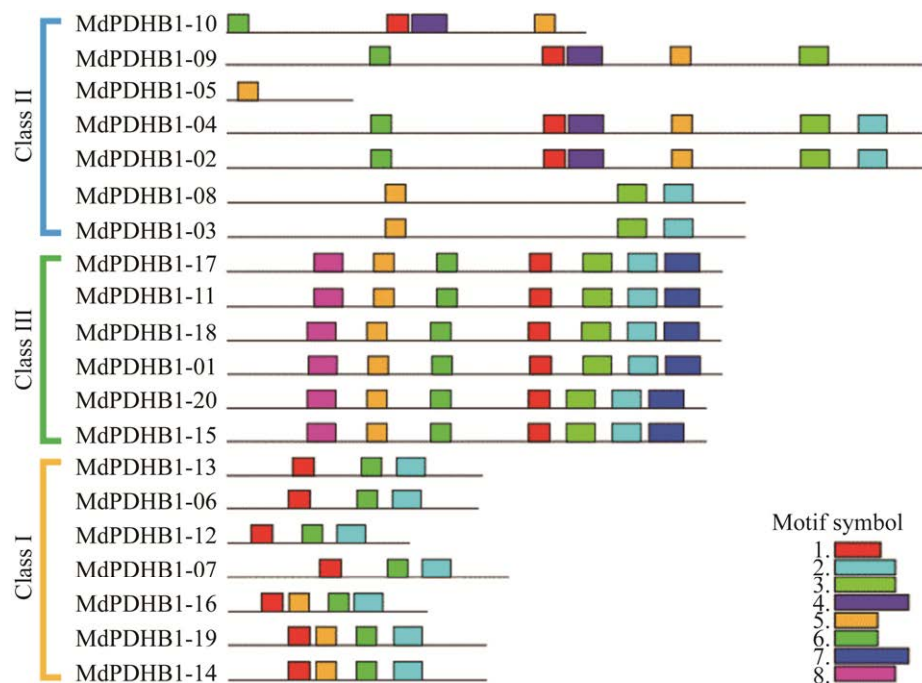


图4 苹果 *PDHB-1* 基因家族保守基序分析

Figure 4 The conservative motif analysis of *PDHB-1* gene family in apple.

表3 苹果 *PDHB-1* 家族候选基因氨基酸保守序列Table 3 Conserved motifs for apple *PDHB-1* family candidate genes

Conserved motif	Length (bp)	Amino acid conserved sequence
Motif1	31	RVFDVPIAEQHAVGFGAGLAAEGLKPFIEIV
Motif2	41	EGKDVAJLGYGSMVQYCLQAAKELEKEGIDVEVIDARSCKP
Motif3	41	FMACLPNMIVMAPSDEAELABMVATAAAIDDRPSCFRFPRG
Motif4	50	CYRRFGHNEIDEPSFTQPKMYKVI RNHPSALTIYQNKLLSESGQVTKEDIE
Motif5	29	DHAILS VIGBGVMLAGQDY EAMTFAGYLD
Motif6	29	AAAKADELLRGMIRD PGPVLFEEGLGYI
Motif7	50	HEILITVEEGSIGGFGSHVAHFLSLDGLLDGPKWRPIVLPDRYIDHGSP
Motif8	41	VELTVAJHHVFNAPQDKIIVDVGHSYPHKILTGRRGKMHT

29–50 之间, 其中 motif2、motif3 和 motif8 均含有 41 个氨基酸残基, motif4 和 motif7 有 50 个氨基酸残基, motif1 有 31 个氨基酸残基, motif5 和 motif6 最少, 只有 29 个氨基酸残基(表 3)。由图 4 可知, 除 Class II 亚族外, 其他亚族内 motif 分布数量和位置基本一致, 具有较好的保守性, 推测亚族内其结构域和功能单位有较高的相似性。在 Class III 亚族中, 各成员 N 端皆为 motif8, C 端皆为 motif7; 在 Class I 亚族中, 各成员 N 端皆为 motif1, C 端皆为 motif2。另外 motif4 只分布在 Class II 亚族内, motif7 和 motif8 只存在于 Class III 亚族, motif3 不在 Class I 亚族内分布, *MdPDHB1-05* 只含有 motif5 且与其他成员相比差异明显。

2.5 苹果 *PDHB-1* 家族共线性分析

由图 5A 可知, 苹果 *PDHB-1* 家族成员之间存在 7 对共线性基因对 (*MdPDHB1-02* 与 *MdPDHB1-04*、*MdPDHB1-04* 与 *MdPDHB1-09*、*MdPDHB1-02* 与 *MdPDHB1-09*、*MdPDHB1-01* 与 *MdPDHB1-18*、*MdPDHB1-11* 与 *MdPDHB1-17*、*MdPDHB1-15* 与 *MdPDHB1-20*、*MdPDHB1-03* 与 *MdPDHB1-08*), 由此推断这 7 对基因是经过大片段的复制而形成的。将苹果基因组与拟南芥、葡萄的基因组进行共线性分析, 如图 5B 所示, 苹果染色体上共发现 21 个位点与拟南

芥共线性, 16 个位点与葡萄共线性。*PDHB-1* 基因共线性位点在染色体上分布不均, 所以染色体上存在共线性关系的基因位点数量都低于 3, 其中 Chr07 和 Chr16 上有 3 个位点与拟南芥共线性, Chr13 和 Chr16 上有 3 个位点与葡萄共线性, 这 3 条染色体上存在的位点数量最多。6 条染色体 (Chr04、Chr06、Chr09、Chr12、Chr14、Chr17) 上没有基因位点与拟南芥和葡萄共线性。

2.6 苹果 *PDHB-1* 家族顺式作用元件分析

通过分析该基因家族起始密码子上游 2 kb 顺式作用元件分布情况如图 6 所示, 筛选出光响应元件(3-AF1 binding site、Box 4、G-box、Gap-box、I-box、P-box、chs-CMA1a、chs-CMA2a、GATA-motif、GT1-motif、TCCC-motif、TCT-motif、Sp1); 与非生物胁迫相关的作用元件包括厌氧诱导响应元件(anaerobically induced response elements, ARE)、低温响应元件(low temperature response element, LTR)、MYB 结合位点诱导干旱响应元件(participate in drought induced MYB binding site, MBS)、防御和胁迫反应响应元件(*cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness, TC-rich repeats)、水杨酸响应元件(*cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness, TCA-element); 与

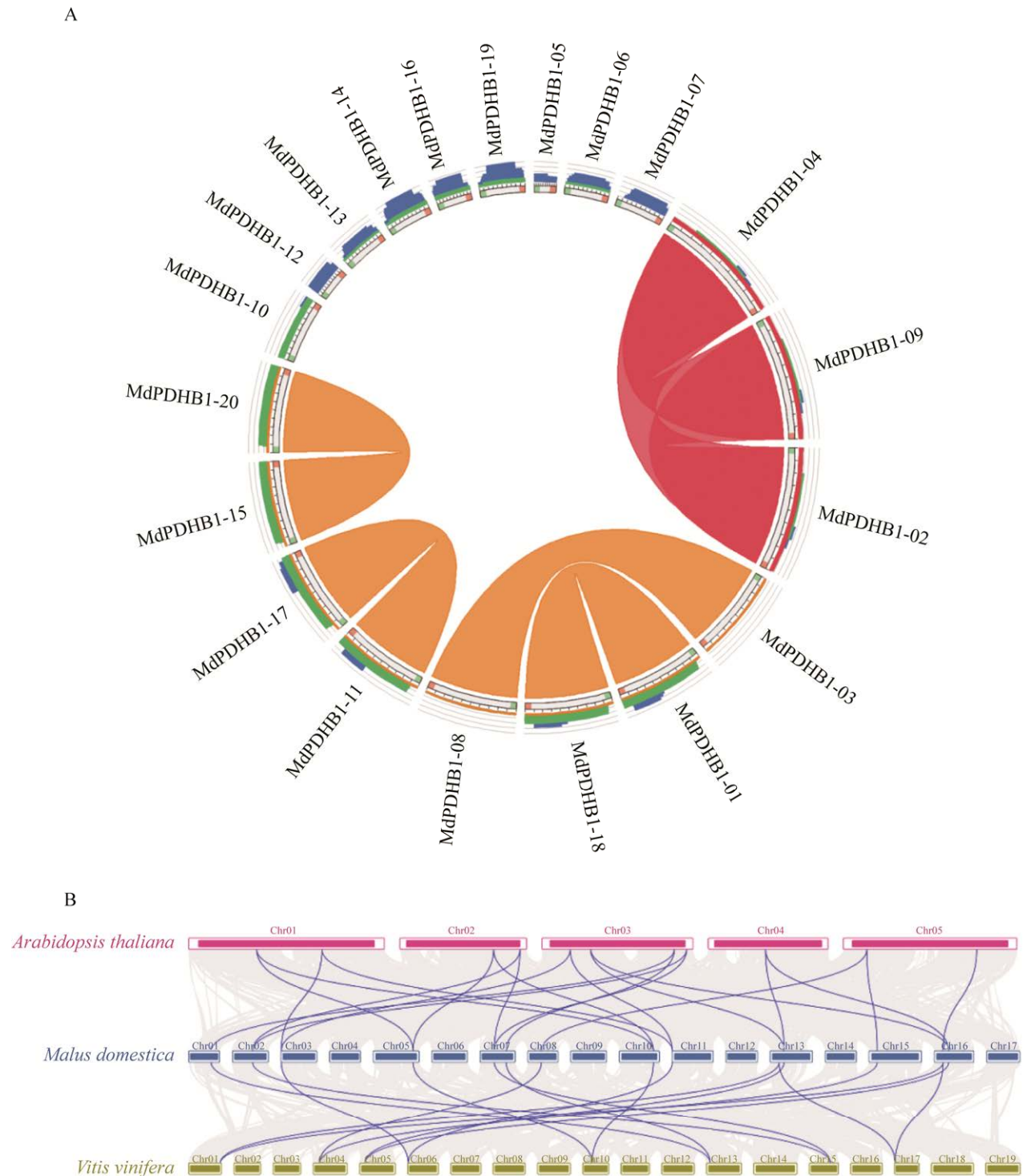


图 5 苹果 *PDHB-1* 基因家族种内及与拟南芥、葡萄的共线性分析

Figure 5 Inter synteny analysis of apple *PDHB-1* gene family and synteny analysis of *PDHB-1* genes in apple, grape and *Arabidopsis*. A: Synteny analysis of *MdPDHB-1* genes. B: Synteny analysis of *PDHB-1* genes among *Arabidopsis*, grape, and apple.

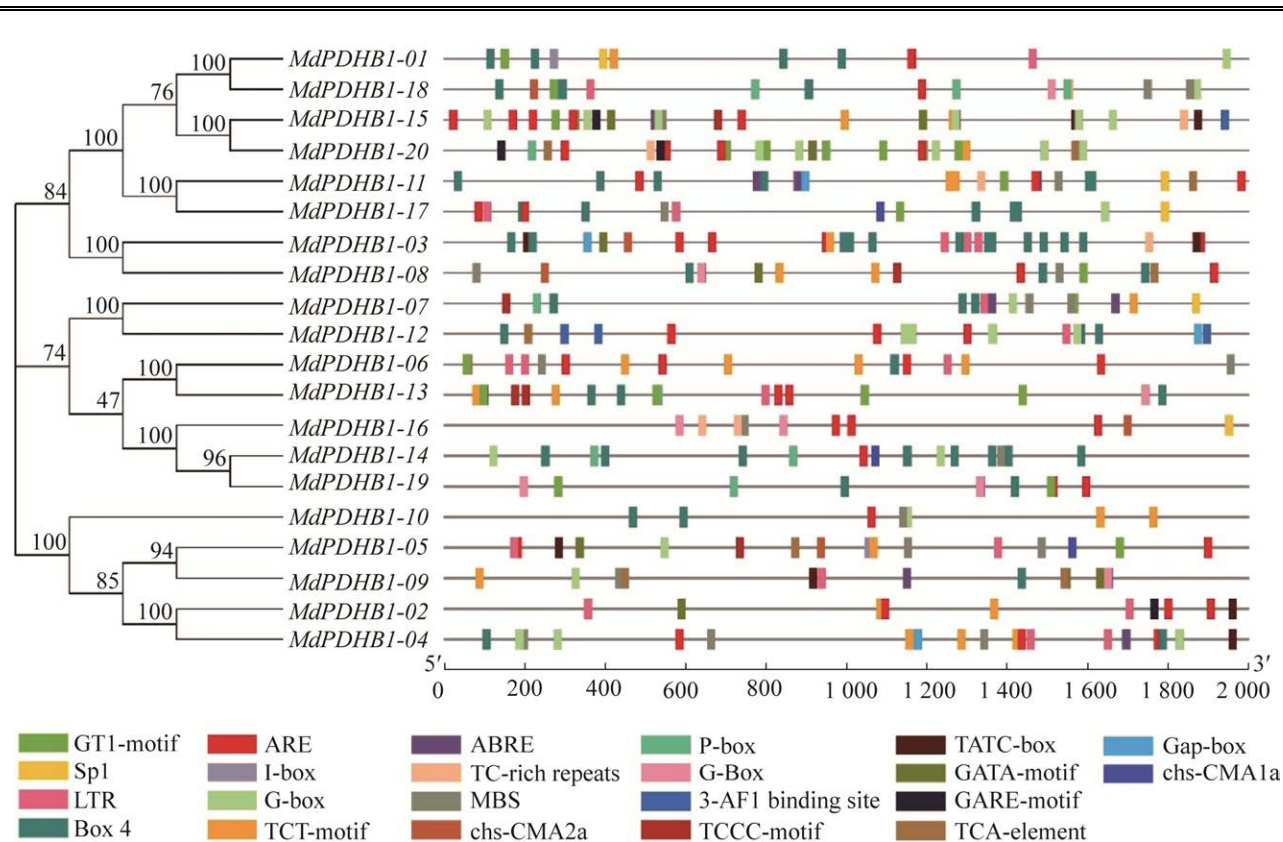


图 6 苹果 *PDHB-1* 家族上游 2 kb 区域顺式作用元件的分布

Figure 6 *Cis*-acting elements distribution in the 2 kb region upstream the *PDHB-1* gene family in apple.

激素调节有关的作用元件包括脱落酸响应元件 (*cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness, ABRE)、赤霉素应答元件 (GARE-motif, TATC-box)。这些元件不均匀地分布在苹果 *PDHB-1* 基因家族成员中, 所有家族成员都含有与光响应有关的元件, 除 *MdPDHB1-07* 和 *MdPDHB1-09* 外其他成员均含有厌氧诱导响应元件 ARE, 其中 Class III 亚族每个成员均有 ARE 元件分布。

2.7 苹果 *PDHB-1* 家族基因的组织特异性表达

苹果 20 个 *PDHB-1* 家族成员并没有在所有器官中表达, 如图 7 所示, *MdPDHB1-05*、*MdPDHB1-06*、*MdPDHB1-09*、*MdPDHB1-10*、*MdPDHB1-11*、*MdPDHB1-12* 和 *MdPDHB1-16*

在大部分器官中几乎不表达。其他成员在果实中的表达量大部分高于其他器官的表达量, *MdPDHB1-18* 在成熟果肉中的表达量明显低于在成熟果皮中的表达量, *MdPDHB1-03*、*MdPDHB1-07*、*MdPDHB1-08* 和 *MdPDHB1-20* 的表达量随着果实的发育而上升, 在成熟的果皮及果肉中表达量较高。

2.8 不同品种苹果可滴定酸含量及 *PDHB-1* 家族的表达分析

根据‘艾斯达’和‘成纪 1 号’两个品种的果皮及果肉匀浆的滴定分析结果, ‘艾斯达’品种的果皮及果肉可滴定酸含量显著大于‘成纪 1 号’ (图 8)。其中‘艾斯达’果皮可滴定酸含量比‘成纪 1 号’果皮可滴定酸含量高约 2.56 倍, ‘艾斯达’果肉可滴定酸含量比‘成纪 1 号’果肉可滴定酸

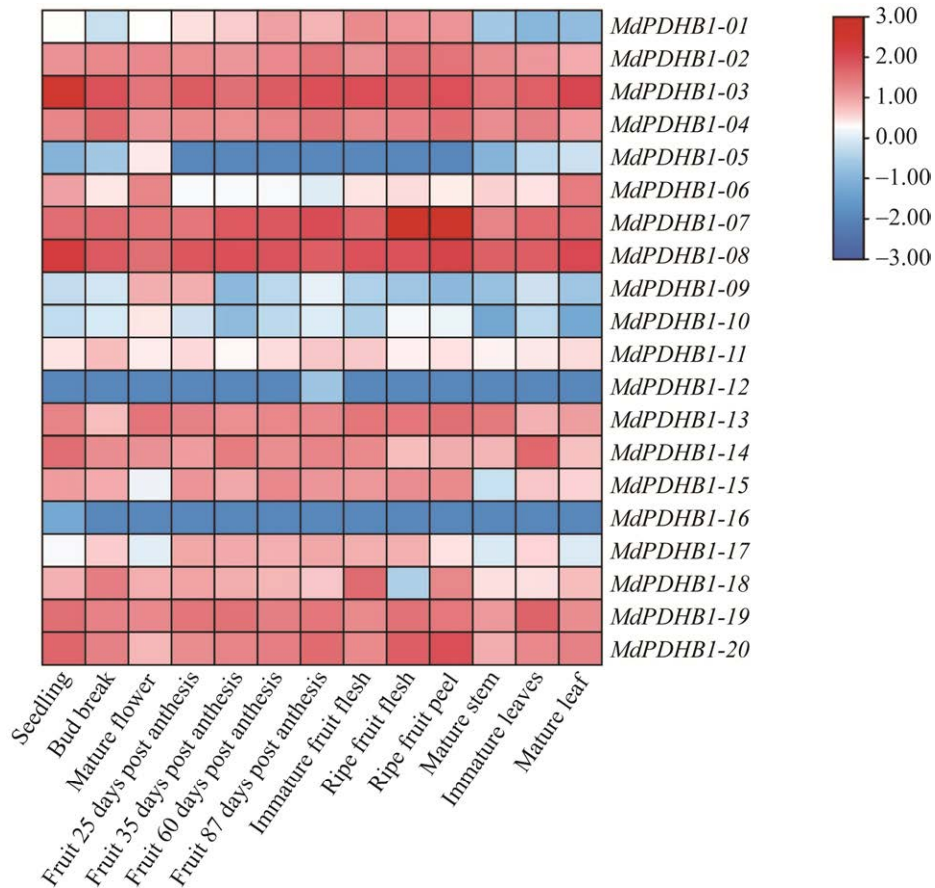


图 7 苹果 *PDHB-1* 基因家族组织特异性表达谱

Figure 7 The specific-tissues expression profile of *PDHB-1* gene family in apple.

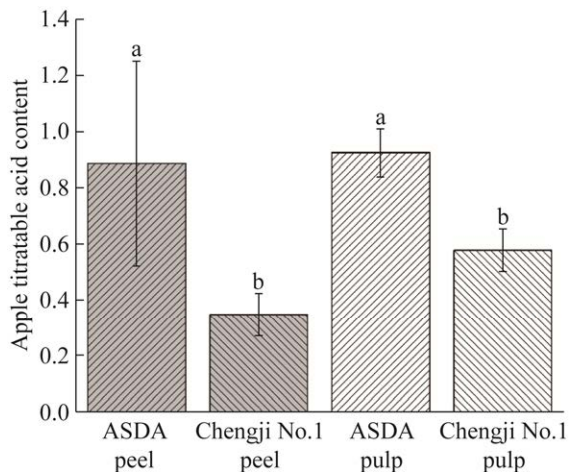


图 8 不同品种苹果的可滴定酸含量

Figure 8 Titratable acid content of different varieties of apple. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

含量高约 1.60 倍，推测‘艾斯达’果实整体可滴定酸度比‘成纪 1 号’高。

qRT-PCR 结果分析得出，苹果 *PDHB-1* 家族候选基因的表达量受到果实品种和果实取样部位的影响，各处理的相对表达量除 *MdPDHB1-03* 外皆存在显著性差异(图 9)。果皮中，*MdPDHB1-02*、*MdPDHB1-04*、*MdPDHB1-06*、*MdPDHB1-07*、*MdPDHB1-09*–*MdPDHB1-12* 和 *MdPDHB1-15*–*MdPDHB1-20* 在‘艾斯达’中的表达量显著高于‘成纪 1 号’，其中 *MdPDHB1-15* 差异最大，在‘艾斯达’中的表达量是‘成纪 1 号’中的 375.30 倍。*MdPDHB1-08* 在‘艾斯达’中的表达量显著低于‘成纪 1 号’，在‘成纪 1 号’中的

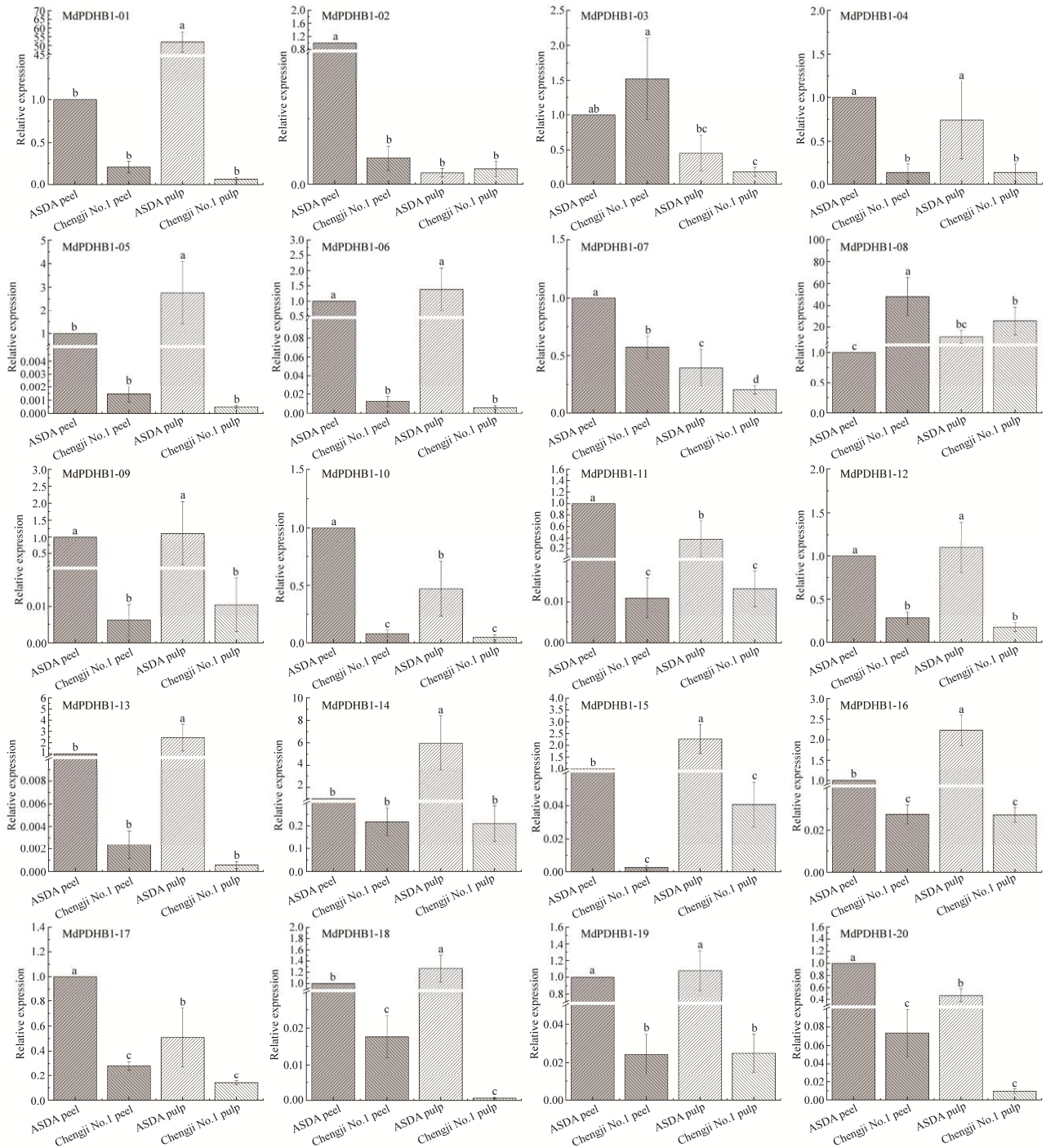


图9 *PDHB-1* 家族基因在不同酸含量苹果品种果皮和果肉中的表达分析

Figure 9 Expression analysis of *PDHB-1* family genes in peel and pulp of apple varieties with different acid contents. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表达量是‘艾斯达’中的 47.05 倍。果肉中, *MdPDHB1-01*、*MdPDHB1-04-MdPDHB1-07*、*MdPDHB1-09-MdPDHB1-20* 在‘艾斯达’中的表达量显著高于‘成纪 1 号’, *MdPDHB1-01* 在‘艾斯达’中的表达量最高, 是‘成纪 1 号’表达量的 829.98 倍。

3 讨论与结论

苹果果实中的有机酸为苹果酸型^[14], 其中对于涉及果实苹果酸积累过程的基因研究备受关注。目前已开展研究的影响果实有机酸含量的基因有很多, 例如 *ALMT* 基因家族、*MYB* 家族和 *TDT* 家族等。铝激活苹果酸转运蛋白 (aluminium activated malate transporter, *ALMT*) 是植物中常见的一类膜蛋白, 在苹果酸转运积累、干旱及盐碱胁迫等过程中均有重要作用, 在 *ALMT* 家族中, *ZjALMT4* 影响着枣果实中苹果酸的转运和积累, 催化苹果酸合成^[15]; *ALMT4-like* 和 *ALMT9-like* 在李果实细胞中除实行苹果酸转运功能外, 与琥珀酸、柠檬酸等组分的转运也有关, 在果实成熟过程中苹果酸含量均有不同程度下降^[16]; *SIALMT9* 是番茄果实中调控苹果酸积累的关键基因^[17]。*MYB* 是参与花青素合成过程中的主要转录因子之一, 在 *MYB* 家族中, *MdMYB1/10* 通过正调节 *MdVHA-B1* 和 *MdVHA-B2* 使得其转基因苹果愈伤组织的苹果酸含量高于野生型^[18]; *MdMYB73* 通过激活 *MdALMT9*、*MdVHA-A* 和 *MdVHP1* 表达, 促进合成苹果酸^[19]; *LcMYB5* 转基因烟草花瓣与叶片的酸度显著高于未转化烟草和矮牵牛, 说明该基因与组织酸化密切相关^[20]。二羧酸液泡膜转运蛋白 (tonoplast dicarboxylate transporter, *TDT*) 是一种参与苹果酸和柠檬酸跨液泡转运过程的转运蛋白, 在 *TDT* 家族中, *PsTDT* 的表达水平变化趋势与李果实生长发育过程中‘皇

冠李’和‘黑琥珀李’的苹果酸含量变化趋势相同, 皆为先上升后下降, 但相关性不高, 推测可能与苹果酸跨液泡膜转运过程是一种多种膜蛋白基因协同调控过程或单基因承担多方任务有关, 可能还与柠檬酸的跨液泡膜转运过程有关^[10]; 在梨果实发育动态过程中, *PbrTDT1* 的表达模式与苹果酸含量变化趋势一致, 推测 *PbrTDT1* 基因不仅仅促进苹果酸积累, 可能对延胡索酸也有促进作用且抑制柠檬酸积累^[21]。

果实酸度是衡量果实内在品质的重要指标之一, 往往可以通过可滴定酸含量进行评价^[16], 本试验通过可滴定酸含量测定表明 2 个品种的苹果果实有机酸含量存在较大差异, ‘艾斯达’果实酸度显著高于‘成纪 1 号’, 直接决定 2 个品种苹果果实的风味差异。目前有大量基因被证明不仅在果实品质调控方面有重要作用, 而且在生长发育过程等其他方面也发挥着不可或缺的作用。*SIANT1* 是番茄花色素苷合成积累途径的一个重要调控因子, 过量表达 *SIANT1* 基因不仅显著提高有机酸含量而且增强了花色素苷的积累, 同时抑制番茄幼苗的生长, 提高了对灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的抗性, 对番茄的生长发育和品质形成有着重要作用^[22]; *TST* 糖转运蛋白家族主要参与植物生物与非生物胁迫应答及生长发育等多种生理过程, 相比野生型 *PpTST2-T* 转基因番茄的果实有机酸含量下降、干旱耐受性提高、生长更快和开花时间提前等^[23]; *CsAIL6* 属于 AP2-结构域乙烯响应转录因子, 对甜橙果实酸度起负调控作用, *CsAHA10* 与定位于液泡膜上的 P 型 H^+ -ATPase 有关, *CsTT8* 属于 bHLH 家族, 与类黄酮代谢途径的调控有关, *CsAHA10*、*CsTT8* 则起正调控作用^[24]; *NADP-ME* 是调控苹果酸降解的关键酶, *NADP-ME* 基因在高酸和低酸品种枇杷果实生长发育过程中, 表达皆呈现先减弱后加强趋势, 且低酸品种表达量低于高

酸品种,低酸品种枇杷果实的苹果酸变化可能还受 *PEPC* 基因调控^[25]。本研究通过生物信息学的方法,在苹果基因组中筛选得到 20 个 *PDHB-1* 家族成员,苹果 *PDHB-1* 家族成员在结构和功能上既有亚族内的相似性,也有少数成员的特殊性。上游 2 kb 顺式作用元件分析表明,与光响应有关的元件数量最多,分布范围最大,说明 *MdPDHB-1* 与植物光响应密切相关,另外 *MdPDHB-1* 家族还含有与非生物胁迫相关的元件,包括低温响应元件、厌氧诱导响应元件、干旱响应元件等。研究表明遮光处理、低温处理、干旱处理等可以通过调节基因上调或下调表达使得果实柠檬酸含量上升^[26],由此推测 *MdPDHB-1* 通过光响应影响植物光合特性,进而影响果实酸度积累,同时 *MdPDHB-1* 基因家族通过响应低温等环境胁迫,进而使得果实的酸含量上升。*MdPDHB-1* 家族还含有激素响应元件,包括赤霉素应答元件和脱落酸响应元件,经赤霉素处理葡萄果实酸度上升,糖酸比下降^[27],预示 *MdPDHB-1* 家族可以通过响应赤霉素等激素处理,进而提高果实酸度。通过综合分析‘艾斯达’和‘成纪 1 号’ 2 个品种果实的果皮和果肉的可滴定酸含量与其 *PDHB-1* 各家族成员的表达量,发现除 *MdPDHB1-02*、*MdPDHB1-03* 和 *MdPDHB1-08* 外,剩余成员的表达量变化趋势与可滴定酸含量变化趋势一致,皆表现为表达水平在酸含量较高的‘艾斯达’中高于酸含量较低的‘成纪 1 号’,由此推测 *PDHB-1* 家族参与了苹果果实酸度积累过程。其中 *MdPDHB1-01* 在‘艾斯达’果肉中表达量最高,*MdPDHB1-15* 在‘艾斯达’果皮中表达水平最显著,推测 *MdPDHB1-01* 在苹果果肉酸度积累过程中及 *MdPDHB1-15* 在苹果果皮酸度积累过程中可能发挥重要作用。本研究为后续该基因在其他园艺作物中的功能及作用机制研究提

供了参考,也为通过其他基因手段改良苹果果实酸度提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] 王皎,李赫宇,刘岱琳,宋新波,於洪建. 苹果的营养成分及保健功效研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 164-168.
WANG J, LI HY, LIU DL, SONG XB, YU HJ. Research progress of apple nutrition components and health function[J]. Food Research and Development, 2011, 32(1): 164-168 (in Chinese).
- [2] 张全艳. 苹果硝态氮应答基因 *MdBT2* 调控苹果酸积累的机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2021.
ZHANG QY. Molecular mechanism of action of nitrate-responsive gene *MdBT2* involved in the regulation of malate accumulation in apple[D]. Taian: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [3] 于建强. 苹果 bHLH 转录因子 *MdbHLH3* 在调控果实糖酸代谢中的功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2022.
YU JQ. The apple bHLH transcription factor *MdbHLH3* functions in regulating the fruit sugar and malate metabolism[D]. Taian: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [4] BEHAL RD. Erratum: a second gene encoding the plastidic pyruvate dehydrogenase beta-subunit in *Arabidopsis* (PGR-99-136) (Plant Physiology (1999) 121 (312))[J]. Plant Physiology, 1999, 121: 1057.
- [5] 崔玉娟,刘晓晴. 丙酮酸脱氢酶复合体的研究进展及应用[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2007, 43(6): 79-83.
CUI YJ, LIU XQ. Development and application of pyruvate dehydrogenase complex[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science Edition), 2007, 43(6): 79-83 (in Chinese).
- [6] 齐彤辉,高萌,袁阳阳,李明军,马锋旺,马百全. 苹果酸度相关基因 *MdPH1* 的克隆、表达及亚细胞定位分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(6): 767-774.
QI TH, GAO M, YUAN YY, LI MJ, MA FW, MA BQ. Cloning expression analysis and subcellular position of *MdPH1* related to acidity in *Malus domestica* Borkh[J]. Plant Science Journal, 2019, 37(6): 767-774 (in Chinese).
- [7] 寇单单,张叶,王朋飞,李东东,张学英,陈海江. ‘仓方早生’桃及其早熟芽变果实蔗糖和苹果酸积累

- 与相关基因表达[J]. 园艺学报, 2019, 46(12): 2286-2298.
- KOU DD, ZHANG Y, WANG PF, LI DD, ZHANG XY, CHEN HJ. Differences in sucrose and malic acid accumulation and the related gene expression in 'Kurakato Wase' peach and its early-ripening mutant[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(12): 2286-2298 (in Chinese).
- [8] 赵静, 周多妮, 朱宏路, 张洋, 谢兴斌, 方从兵. FaMYB73 调控草莓果实苹果酸合成的研究[J]. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1638-1645.
- ZHAO J, ZHOU DN, ZHU HL, ZHANG Y, XIE XB, FANG CB. R2R3-MYB transcription factor FaMYB73 involved in malic acid accumulation of strawberry fruits[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(10): 1638-1645 (in Chinese).
- [9] 韩寿坤. 苹果采后苹果酸含量及其转运体基因 *MdALMT9* 调控机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2020.
- HAN SK. Regulation mechanisms of malate content and malate transporter gene *MdALMT9* in postharvest apple fruit[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [10] 巫伟峰, 陈明杰, 祁芳斌, 陈发兴. 李果实有机酸组成特征及其与苹果酸转运体基因 *PsALMT9* 和 *PstDT* 的相关性[J]. 西北植物学报, 2020, 40(8): 1356-1363.
- WU WF, CHEN MJ, QI FB, CHEN FX. Organic acid composition characteristics and its correlation with malate transporter genes *PsALMT9* and *PstDT* in plum fruit[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(8): 1356-1363 (in Chinese).
- [11] 马聪. 草莓果实糖酸相关 *FaSSADH* 和 *FaSDH2-2* 基因的克隆与表达分析[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2021.
- MA C. Cloning and expression analysis of sugar and acid related *FaSSADH* and *FaSDH2-2* genes in strawberry fruit[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2021 (in Chinese).
- [12] 高萌. 苹果种质资源有机酸含量评价及酸含量调控候选基因 *MtPEPP* 功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
- GAO M. Evaluation of organic acid content in apple germplasm resources and functional analysis of candidate gene *MtPEPP* for acidity[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [13] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2009: 262-264.
- ZHANG ZL, QU WJ, LI XF. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2009: 262-264 (in Chinese).
- [14] YAMAKI S. Isolation of vacuoles from immature apple fruit flesh and compartmentation of sugars, organic acids, phenolic compounds and amino acids[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1984, 25(1): 151-166.
- [15] 吴梦嘉. 枣和酸枣有机酸含量差异分析以及关键基因筛选[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2021.
- WU MJ. Difference analysis of organic acid content and screening of key genes between Jujube and sour Jujube[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [16] 巫伟峰. 李果实苹果酸转运体的克隆表达及其有机酸的关联性分析[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2017.
- WU WF. Cloning and expression analysis of malate transporter in plum fruit and analysis of the correlation of organic acids[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2017 (in Chinese).
- [17] YE J, WANG X, HU TX, ZHANG FX, WANG B, LI CX, YANG TX, LI HX, LU YE, GIOVANNONI JJ, ZHANG YY, YE ZB. An InDel in the promoter of *AI-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9* selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(9): 2249-2268.
- [18] HU DG, SUN CH, MA QJ, YOU C, CHENG L, HAO Y. MdMYB1 regulates anthocyanin and malate accumulation by directly facilitating their transport into vacuoles in apples[J]. *Plant Physiology*, 2015, 170: 1315-1330.
- [19] HU DG, LI YY, ZHANG QY, LI M, SUN CH, YU JQ, HAO YJ. The R2R3-MYB transcription factor MdMYB73 is involved in malate accumulation and vacuolar acidification in apple[J]. *The Plant Journal*, 2017, 91(3): 443-454.
- [20] LAI B, DU LN, HU B, WANG D, HUANG XM, ZHAO JT, WANG HC, HU GB. Characterization of a novel litchi R2R3-MYB transcription factor that involves in anthocyanin biosynthesis and tissue acidification[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-13.
- [21] 许林林. 梨液泡膜上 *PbrALMT9*、*PbrTDT1* 和 *PbrVHA-c4* 基因调控有机酸积累的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2018.

- XU LL. Functional analysis of tonoplast-localized genes, *PbrALMT9*, *PbrTDT1* and *PbrVHA-c4*, regulate the accumulation of organic acids in pear[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [22] 龙涛, 王仙慧, 陈邦兰, 王治杰, 尹茂灵, 万心言, 刘继恺, 高永峰. 过表达 *SIANT1* 基因对番茄生长和果实品质的影响[J]. 分子植物育种, 2023, 21(2): 495-502.
- LONG T, WANG XH, CHEN BL, WANG ZJ, YIN ML, WAN XY, LIU JK, GAO YF. Effects of *SIANT1* gene overexpression on the growth and fruit quality of tomato[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(2): 495-502 (in Chinese).
- [23] 王宁. 桃 *PpTST2* 基因的克隆及功能鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2022.
- WANG N. Cloning and functional identification of *PpTST2* gene in peach[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [24] 曹明浩. 柑桔果实发育过程中甜度相关基因的系统生物学与反向生物学研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2020.
- CAO MH. Systems biology and reverse genetic studies of sweetness-related genes during citrus fruit development[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [25] 谢成宇. 枇杷果实发育过程中 *NADP-ME* 和 *PEPC* 基因的表达[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2008.
- XIE CY. *NADP-ME* and *PEPC* gene expression during the fruit development of loquat[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [26] 罗丽娟. 环境因子对柑橘柠檬酸积累及其相关基因的影响[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2019.
- LUO LJ. Effects of environmental factors on citric acid accumulation and its related genes in citrus[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [27] 王寒阳. GA3 处理对两个鲜食葡萄品种品质的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017.
- WANG HY. Effect of GA3 treatment on quality of two table grape varieties[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)