

# 苹果柠檬酸合酶 3 基因家族成员鉴定及表达分析

李心蕊<sup>1</sup>, 李文芳<sup>1\*</sup>, 霍嘉兴<sup>1</sup>, 李龙<sup>1</sup>, 陈佰鸿<sup>1</sup>, 郭志刚<sup>2</sup>, 马宗桓<sup>1</sup>

1 甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070

2 天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃 天水 741000

李心蕊, 李文芳, 霍嘉兴, 李龙, 陈佰鸿, 郭志刚, 马宗桓. 苹果柠檬酸合酶 3 基因家族成员鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 137-149.

LI Xinrui, LI Wenfang, HUO Jiaying, LI Long, CHEN Baihong, GUO Zhigang, MA Zonghuan. Identification and expression analysis of citrate synthase 3 gene family members in apple[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 137-149.

**摘要:** 柠檬酸合酶(citrate synthase 3, CS3)是细胞代谢途径中的关键酶之一, 其活性调节着生物体的物质和能量代谢过程。本研究旨在从苹果全基因组中鉴定 CS3 基因家族成员, 并进行生物信息学和表达模式分析, 为研究苹果 CS3 基因的潜在功能提供理论基础。利用 BLASTp 基于 GDR 数据库鉴定苹果 CS3 家族成员, 通过 Pfam、SMART、MEGA5.0、clustalx.exe、ExpASY Proteomics Server、MEGAX、SOPMA、MEME 和 WoLF PSORT 等软件分析 CS3 蛋白序列基本信息、亚细胞定位情况、结构域组成、系统进化关系以及染色体定位情况。利用酸含量的测定和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术检测苹果 6 个 CS3 的组织表达和诱导表达特性。苹果 CS3 基因家族包含 6 个成员, 这些 CS3 蛋白包括 473–608 个不等的氨基酸残基, 等电点分布在 7.21–8.82。亚细胞定位结果显示 CS3 蛋白分别定位在线粒体和叶绿体。系统进化分析可将其分为 3 类, 各亚家族基因数量分别为 2 个。染色体定位结果显示, CS3 基因分布在苹果不同的染色体上。蛋白二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主, 其次是无规则卷曲,  $\beta$ -转角所占比例最小。筛选的 6 个家族成员在不同苹果组织中均有表达, 整体表达趋势从高到低依次为 *MdCS3.4* 相对表达含量最高, *MdCS3.6* 次之, 其他家族成员相对表达量依次为 *MdCS3.3*>*MdCS3.2*>*MdCS3.1*>*MdCS3.5*。qRT-PCR 结果显示, *MdCS3.1* 和 *MdCS3.3* 基因在酸含量较低的‘成纪 1 号’果肉中相对表达量最高, 酸含量较高的‘艾斯达’果肉中 *MdCS3.2* 和 *MdCS3.3* 基因相对表达量最高。因此, 本研究对不同苹果品种中 CS3 基因相对表达量进行了检测, 并分析了其在苹果果实酸合成过程中的作用。结果表明, CS3 基因在不同苹果品种中的相对表达量存在差异, 为后续研究苹果品质形成机制提供了参考。

**关键词:** 苹果; 柠檬酸合酶(CS3)基因家族; 生物信息学; 柠檬酸; 表达分析

资助项目: 甘肃省大学生创新创业训练计划(S202210733008); 甘肃省科技计划项目(21JR7RA845); 天水市秦州区科技支撑计划项目(2021-JHGLG-9885); 甘肃农业大学 2021 年度盛彤笙创新基金专项项目(GSAU-STS-2021-28)

This work was supported by the Gansu Students' Project for Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202210733008), the Gansu Provincial Science and Technology Planning Project (21JR7RA845), the Tianshui City Qinzhou District Science and Technology Support Plan Project (2021-JHGLG-9885), and the 2021 Sheng Tongsheng Innovation Fund Special Project of Gansu Agricultural University (GSAU-STS-2021-28).

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

Received: 2023-03-05; Accepted: 2023-05-22; Published online: 2023-05-25

## Identification and expression analysis of citrate synthase 3 gene family members in apple

LI Xinrui<sup>1</sup>, LI Wenfang<sup>1\*</sup>, HUO Jiaxing<sup>1</sup>, LI Long<sup>1</sup>, CHEN Baihong<sup>1</sup>, GUO Zhigang<sup>2</sup>, MA Zonghuan<sup>1</sup>

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

2 College of Biotechnology and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741000, Gansu, China

**Abstract:** As one of the key enzymes in cell metabolism, the activity of citrate synthase 3 (CS3) regulates the substance and energy metabolism of organisms. The protein members of CS3 family were identified from the whole genome of apple, and bioinformatics analysis was performed and expression patterns were analyzed to provide a theoretical basis for studying the potential function of CS3 gene in apple. BLASTp was used to identify members of the apple CS3 family based on the GDR database, and the basic information of CS3 protein sequence, subcellular localization, domain composition, phylogenetic relationship and chromosome localization were analyzed by Pfam, SMART, MEGA5.0, clustalx.exe, ExpASY Proteomics Server, MEGAX, SOPMA, MEME, WoLF PSORT and other software. The tissue expression and inducible expression characteristics of 6 CS3 genes in apple were determined by acid content and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Apple CS3 gene family contains 6 members, and these CS3 proteins contain 473-608 amino acid residues, with isoelectric point distribution between 7.21 and 8.82. Subcellular localization results showed that CS3 protein was located in mitochondria and chloroplasts, respectively. Phylogenetic analysis divided them into 3 categories, and the number of genes in each subfamily was 2. Chromosome localization analysis showed that CS3 gene was distributed on different chromosomes of apple. The secondary structure of protein is mainly  $\alpha$ -helix, followed by random curling, and the proportion of  $\beta$ -angle is the smallest. The 6 members were all expressed in different apple tissues. The overall expression trend from high to low was the highest relative expression content of *MdCS3.4*, followed by *MdCS3.6*, and the relative expression level of other members was in the order of *MdCS3.3*>*MdCS3.2*>*MdCS3.1*>*MdCS3.5*. qRT-PCR results showed that *MdCS3.1* and *MdCS3.3* genes had the highest relative expression in the pulp of 'Chengji No. 1' with low acid content, and *MdCS3.2* and *MdCS3.3* genes in the pulp of 'Asda' with higher acid content had the highest relative expression. Therefore, in this study, the relative expression of CS3 gene in apple cultivars with different acid content in different apple varieties was detected, and its role in apple fruit acid synthesis was analyzed. The experimental results showed that the relative expression of CS3 gene in different apple varieties was different, which provided a reference for the subsequent study of the quality formation mechanism of apple.

**Keywords:** apple; citrate synthase 3 (CS3) gene family; bioinformatics; citric acid; expression analysis

柠檬酸合酶(citrate synthase 3, CS3)是细胞内多种重要代谢途径的关键酶。CS3 催化了草酰乙酸和乙酰辅酶 A 之间的缩合反应,从而促进了柠檬酸和辅酶 A 的生成。该催化剂对底物具有选择性好、催化活性高的优点,在医药和食品加工领域有着广泛的应用前景。作为细胞代谢途径中的重要酶之一,CS3 的活性调节着生物体的物质和能量代谢过程,而 CS3 的活力则受到运动、神经刺激和激素分泌等一系列生理过程的影响而发生变化。

苹果(*Malus domestica* Borkh.)为蔷薇科苹果属植物,分布广泛,苹果果实中富含维生素和矿物质,为人们最常食用的水果之一。近年来,苹果产业发展迅速,苹果品种的多样化、品质的差异化都是不同苹果品种性质差异的体现。苹果酸、柠檬酸和奎宁酸等有机酸对水果的感官品质有很大影响,是水果风味形成的关键成分<sup>[1]</sup>。苹果酸和柠檬酸是成熟苹果果实以及许多其他肉质果实中的主要有机酸<sup>[2]</sup>。2 种酸在果实细胞中的积累是发生在细胞不同区域的几个相互关联的过程的结果,并且受到许多因素的控制<sup>[3]</sup>。

柠檬酸合酶是一种高度保守的酶,几乎遍布于所有生物体内,其参与的生理过程包括线粒体能量代谢、种子萌发、植物生长发育以及抗逆等多个方面。研究发现,通过农杆菌介导法导入外源基因 CS 到水稻基因组中,改善了水稻低磷敏感性能<sup>[4]</sup>;油茶受到低磷胁迫后根系的 *CoCS* 基因的表达受到低磷诱导,表达量呈现先升高后降低的趋势<sup>[5]</sup>;控制 CS 基因的过量表达可更有效地增加转基因烟草中 CS 的酶活性及叶片中柠檬酸的合成量,同时也能更有效地提高转基因烟草柠檬酸的分泌量,从而增强其对铝毒害的抵御能力<sup>[6]</sup>;紫花苜蓿的耐铝性和对磷的吸收方向的研究已取得初步进展<sup>[7]</sup>;甜橙叶片中柠檬酸合酶基因的表达与果实酸含量呈正相关<sup>[8]</sup>;香蕉果实成熟与 CS 基因的关系研究已经取得初步进展<sup>[9]</sup>;

柠檬酸在许多果实中占重要地位,柠檬酸的含量会影响果实的口感和酸度,在榔梅、酸橙、草莓中已有柠檬酸活性与果实品质的相关关系的研究<sup>[10-12]</sup>;在相关研究中已经发现植物根瘤固氮与柠檬酸合酶有关<sup>[13]</sup>;此外种子的萌发也受到柠檬酸合酶的影响<sup>[14-15]</sup>。综上所述,该酶基因对掌握苹果生长发育的调控机理与果实的品质均有重要的研究意义。但有关 CS 家族基因的序列特性、组织表达特性和不同酸含量苹果中的表达模式尚未见报道。本研究采用生物信息学方法,对苹果 CS3 基因家族成员进行鉴定和序列分析比较,分析苹果 CS3 基因家族成员组织表达特异性,并测定不同品种中苹果的酸含量,为进一步研究苹果 CS3 家族成员的结构与功能,并应用于苹果品种的遗传改良提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和处理

试验材料为静宁县果树果品研究所的‘艾斯达’和‘成纪 1 号’苹果果实。2021 年 10 月分别取已经成熟的‘艾斯达’和‘成纪 1 号’苹果的果皮和果肉各 1 g,设置 5 个生物学重复,液氮速冻后置于-80 °C超低温冰箱贮藏,用于苹果 CS3 基因的表达水平分析。

### 1.2 苹果 CS3 基因家族成员鉴定

从 NCBI 在线数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找苹果 CS3 基因的基因号。在 Pfam (<https://pfam.xfam.org/>)和 SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/save\\_-user\\_preferences.pl](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/save_-user_preferences.pl))数据库中将没有特定结构域或结构域不完整的基因去除。最后筛选得到 6 个苹果基因家族成员,从苹果基因组数据库下载编码序列(coding sequence, CDS)、基因全长和蛋白序列。将获得的 CDS 输入到苹果基因库中,获得苹果 CS3 基因组成员信息([http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast\\_server/projet\\_ML/blast.pl](http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl))。

### 1.3 苹果 CS3 基因家族进化关系、基因结构、motif 序列及生物信息学分析

基于 ExPASy 数据库(<https://web.expasy.org/protparam/>) Protparam 在线软件分析蛋白质等电点、氨基酸数量、脂肪系数、氨基酸大小、不稳定性系数及分子量等基本信息,通过 MEGA 5.0 及 clustalx.exe 分析蛋白系统进化关系,通过邻接法建立系统进化树,通过 SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.plpage=/NPSA/npsa\\_-hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=/NPSA/npsa_-hnn.html))在线分析软件预测蛋白质二级结构。用 MEME (<http://memesuite.org/>)在线程序分析 CS3 基因家族保守基序<sup>[16]</sup>,将预测基序 Motif 的数目设定为 10 个,使用在线软件 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)来展示基因结构。用 PlantCARE (<http://bioin-formatiCS.psb.ugent.be/webtools/plantcare.html>)预测并分析苹果 CS3 基因家族起始密码子上游 2 kb 的碱基片段顺式作用元件的分布情况,采用 WoLF PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)进行亚细胞定位分析。

### 1.4 苹果 CS3 基因家族的实时荧光定量 PCR 分析

利用中科瑞泰(北京)生物科技有限公司的植物萃取试剂盒 RNAPlant-RTR2303 进行了苹果果皮和果肉 RNA 的提取。引物设计通过生工生物工程(上海)股份有限公司([https://www.sangon.com/newPrimer\\_Design](https://www.sangon.com/newPrimer_Design))的在线软件完成(表 1),

并由该公司合成。cDNA 的合成使用 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus)反转录聚合酶的反转录试剂盒,反转录合成的 cDNA 产物可直接用于实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测,并将反转录产物保存在-20 °C冰箱。qRT-PCR 使用 Light Cycler<sup>®</sup> 96 RealTime PCR System(Roche)型实时定量 PCR 仪,使用所设计的引物,进行 PCR 扩增,其中,以苹果 GAPDH 基因为内参基因,整个扩增体系为 20 μL,含有 2 μL cDNA,上游和下游引物各 1 μL, SYBR MIX 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL;反应步骤为:95 °C 变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 进行 40 个循环。试验设置 3 个重复,应用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法,计算各基因的相对表达量。

### 1.5 不同苹果中酸含量的测定

剔除试样的非可食部分,分别取‘艾斯达’和‘成纪 1 号’的果皮和果肉各 1 g 切碎混匀,置研钵中研碎,用 5 mL 水洗入 10 mL 容量瓶,置 85 °C 水浴 30 min,期间摇动数次,取出冷却,加水至刻度,摇匀过滤,吸取滤液 5 mL 放入烧杯中,加酚酞指示剂 2 滴,用 0.1 mol/L NaOH 滴定,直至呈淡红色 30 s 不褪色为终点,记下 NaOH 液用量,重复滴定 3 次,取其平均值。

表 1 苹果 CS3 基因家族实时荧光定量引物

Table 1 Real-time fluorescent quantitative primers for apple CS3 gene family

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>MdCS3.1</i>	CTTTCCAAGCTCCGTTCTCGTCTC	ATCTGTGGAGGTCTGCGTTTGAATC
<i>MdCS3.2</i>	AGGGTCTTCTGTGGCTGCTTTTAAC	GGCACGAGTCCTCAATTCCTTGG
<i>MdCS3.3</i>	CACCTGGTACTATGCGTTCTCTTGG	CACCTGGTACTATGCGTTCTCTTGG
<i>MdCS3.4</i>	TTGTGGTTCAAGCGTAGCCTTCC	GCCAGCCCTAGCAGTTACTATTGAG
<i>MdCS3.5</i>	GAGGGATGCTGGTGCTGTTGTTTC	ATCTTCAGGGATTTGTGGAGGCTTG
<i>MdCS3.6</i>	CGGTAAGAGGTATCAGGTCCAGGTC	CGAACAGGGGCGGTATTAAGATAGC
<i>GAPDH</i>	CATTCATCACCCGACTACA	GAAGGGTCTTCTCATCCTTGAC

计算公式:

$$\text{含酸量} = \frac{V_A \times c \times \text{折算系数}}{V_B} \times \frac{V_T}{m} \times 100\%$$

式中,  $V_T$ : 样品提取液总体(mL);  $V_B$ : 滴定时所取滤液体积(mL);  $c$ : NaOH 滴定液浓度(mol/L);  $V_A$ : 滴定滤液消耗的 NaOH 溶液体积(mL);  $m$ : 样品质量(g)。

### 1.6 试验数据统计与分析使用

Excel 2010 处理试验数据,并用 Origin 2018 绘图,利用 SPSS v.22.0 进行统计分析,使用单因素 ANOVA 的 Duncan 比较差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 CS3 基因家族的系统进化关系

从苹果基因组序列中鉴定得到 6 个 CS3 家族成员。为分析蛋白间的系统进化关系,采用 MEGA 5.0 和 clustalx.exe 分析软件对 6 个苹果的 6 个 CS3 与山茶(*CsCS*)、大豆(*GmCS3*)、甜橙(*CitCS*)、桃(*PpCS*)、香蕉(*MaCS*)、亚麻荠(*CcCS*)和拟南芥(*AtCS*, *AtCS1*, *AtCS2*, *AtCS5*)等的 CS3 蛋白序列进行比对分析和系统进化树构建。如图 1 所示,根据亲缘关系将所有 CS3 蛋白分成 3 组,

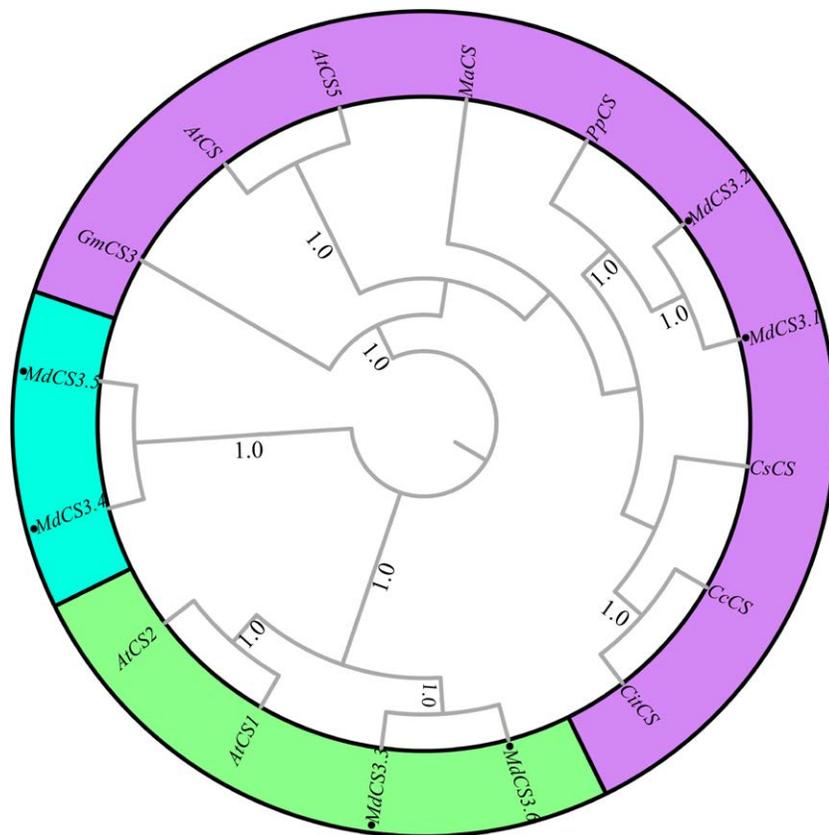


图 1 苹果 CS3 基因家族的系统进化关系

Figure 1 Phylogenetic relationship of CS3 gene family in apple.

*MdCS3.1-3.6* 基因分别位于进化树 3 大分支上, 与拟南芥和桃聚类在同一类群, 距离最近。

## 2.2 苹果 CS3 基因家族蛋白理化性质分析和亚细胞定位

利用拟南芥、苹果氨基酸序列在苹果基因组网站 BLAST 进行比对, 去除重复序列, 依据苹果 CS3 筛选, 共获得 6 个苹果 CS3 基因。依据染色体位置, 将登录号分别为 Md00G1055300、Md02G1319300、Md09G1156400、Md13G1153500、Md16G1154000 和 Md17G1142900 的 CS3 基因家族成员依次命名为 *MdCS3.1-3.6* (表 2)。对苹果 CS3 基因家族蛋白质理化性质分析可知, 其编码的氨基酸数量以 473–608 aa 为主, *MdCS3.4* 蛋白的氨基酸序列最长, *MdCS3.1* 和 *MdCS3.2* 蛋白的氨基酸序列等长且最短, 其分子量为 52 606.80–65 903.68 kDa, 等电点为 7.21–8.82, 不稳定系数为 27.66–37.80, 表明这类蛋白大都为不稳定蛋白, 脂肪系数为 91.60–96.62。对该基因家族成员进行亚细胞定位分析得出 *MdCS3.1*、*MdCS3.2* 和 *MdCS3.5* 基因主要位于线粒体, *MdCS3.3*、*MdCS3.4* 和 *MdCS3.6* 基因主要位于叶绿体。

## 2.3 苹果 CS3 基因家族的二级结构分析

通过对苹果 CS3 基因家族的蛋白质二级结构进行预测分析, 发现其主要成分为  $\alpha$ -螺

旋, 然后是无规则卷曲, 而  $\beta$ -转角所占的比重最少。在这些结构中,  $\alpha$ -螺旋的含量在 41.12%–56.24%之间, 不规则卷曲的含量在 28.33%–39.45%之间。此外, 在  $\alpha$ -螺旋结构中, *MdCS3.1* 和 *MdCS3.2* 所占的比例最大, *MdCS3.5* 所占的比重最小, 而在不规则卷曲结构中, 则是 *MdCS3.6* 所占比重最大, *MdCS3.1* 和 *MdCS3.2* 不规则卷曲的比重最小(图 2)。据此可以推测,  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲结构支配着基因家族结构的形成过程。

## 2.4 苹果 CS3 基因家族的基因结构和共线性分析

利用 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)在线分析获得 6 个 CS3 基因家族成员的基因结构图(图 3)。*MdCS3.1-3.6* 均具有上游和下游基因序列, 且包含内含子和外显子, 结构完整。*MdCS3.1* 基因较长, 不同于其他 *MdCS3* 基因, 具有 18 个内含子和 19 个外显子。

利用 Circoletto@the BAT cave (<http://tools.bat.infospire.org/circoletto/>)在线分析 6 个 CS3 基因家族成员的共线性(图 4)。由图可知, *MdCS3.1-3.6* 分别位于 Chr0、Chr2、Chr9、Chr13、Chr16 和 Chr17 这 6 条不同的染色体上, 通过共线性分析发现, *MdCS3.5* 和 *MdCS3.4* 的共线性较弱, 其余 4 个基因间均存在基因对。

表 2 苹果 CS3 基因家族蛋白理化性质分析

Table 2 Physicochemical properties of CS3 gene family proteins in apple

Gene	Gene accession No.	Amino acid	Molecular weight (kDa)	pI	The instability index	Aliphatic index	Subcellular localization
<i>MdCS3.1</i>	Md00G1055300	473	52 606.80	8.82	27.66	96.62	Mitochondria
<i>MdCS3.2</i>	Md02G1319300	473	52 648.65	7.21	28.01	95.60	Mitochondria
<i>MdCS3.3</i>	Md09G1156400	514	56 806.22	8.79	36.61	91.89	Chloroplast
<i>MdCS3.4</i>	Md13G1153500	608	65 903.68	7.56	32.64	92.24	Chloroplast
<i>MdCS3.5</i>	Md16G1154000	608	65 851.50	7.56	31.27	91.60	Mitochondria
<i>MdCS3.6</i>	Md17G1142900	512	56 532.81	8.79	37.80	92.05	Chloroplast

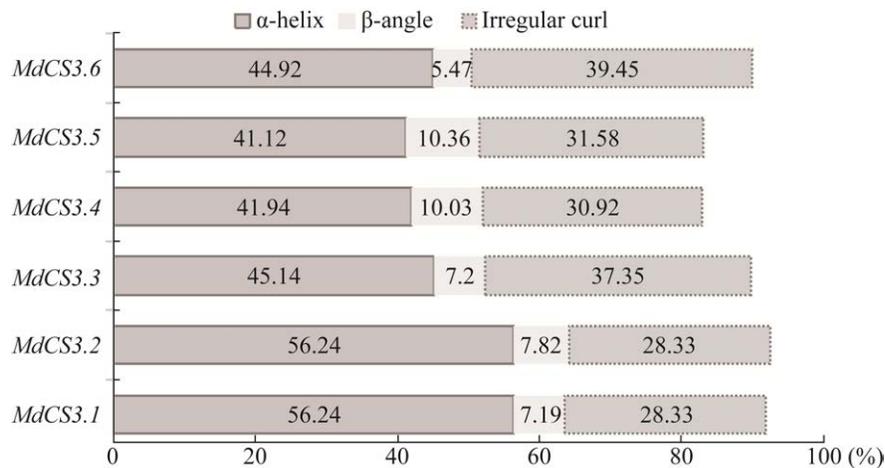


图 2 苹果 CS3 基因家族的二级结构分析

Figure 2 Secondary structure analysis of apple CS3 gene family.

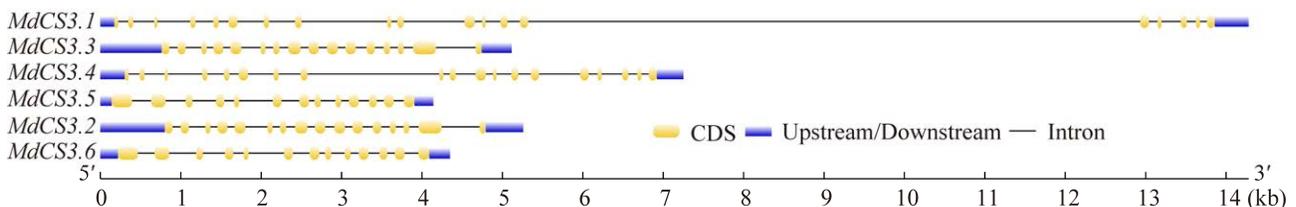


图 3 苹果 CS3 基因家族的基因结构分析

Figure 3 Analysis of gene structure of apple CS3 gene family.

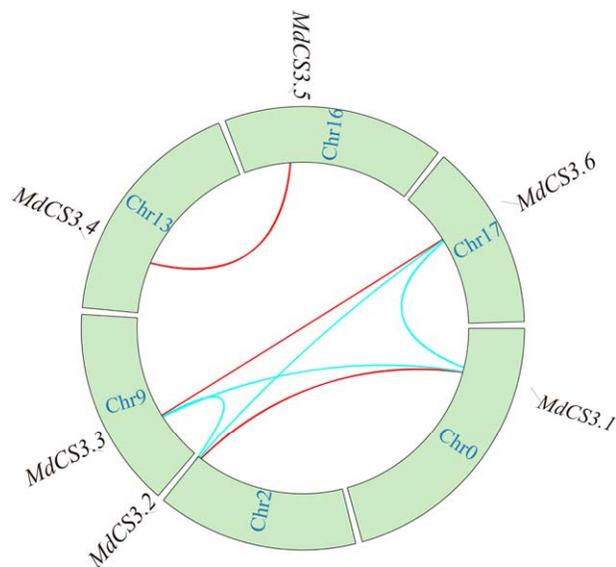


图 4 苹果 CS3 基因家族成员基因定位和共线性分析

Figure 4 Gene localization and collinearity analysis of CS3 gene family members in apple.

## 2.5 苹果 CS3 基因家族 motif 序列分析

所有 CS3 基因家族成员中均包含 motif 1、motif 2 和 motif 3，且 *MdCS3.5* 和 *MdCS3.4* 的 motif 1 位点数量多于 motif 2 和 motif 3 位点数量 (图 5)。通过进化树分析，该基因家族成员分为 3 个分支，同一进化树分支上的 motif 位点相同，由此推测 *MdCS3.3* 和 *MdCS3.6*、*MdCS3.5* 和 *MdCS3.4*、*MdCS3.1* 和 *MdCS3.2* 基因间分别具有相同的结构和特性。

## 2.6 苹果 CS3 家族启动子区顺式作用元件预测

选取苹果 CS3 家族中每个成员上游 2 000 bp 启动子序列，用 PLANT Care 在线分析软件对其顺式作用元件进行了预测。结果如表 3 所示，苹果 CS3 家族中不仅存在着 CAAT-box、TATA-box 等转录调控元件，而且还存在着许多与植物逆

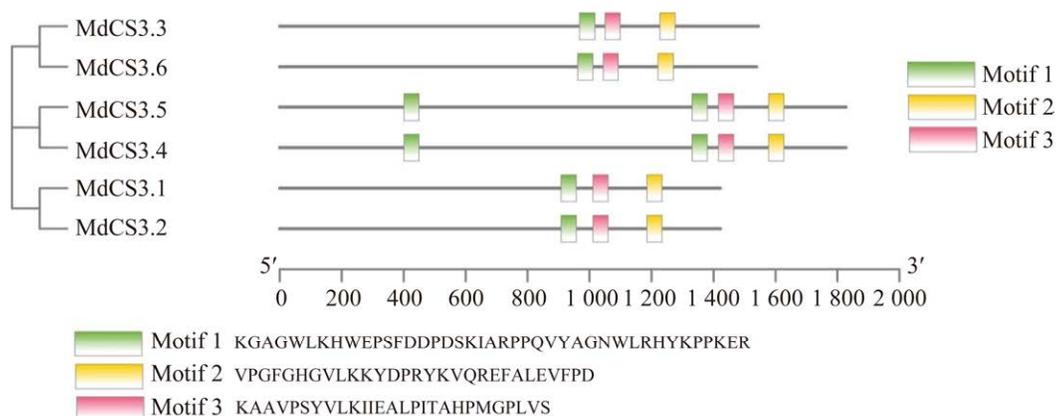


图5 苹果 CS3 基因家族进化树及 motif 序列分析

Figure 5 Phylogenetic tree and motif analysis of apple CS3 gene family.

表3 CS3 基因家族上游 2 000 bp 区域顺式作用元件的分布

Table 3 Distribution of *cis*-acting elements in the 2 000 bp upstream region of the CS3 gene family

Type	Elements	<i>MdCS3.1</i>	<i>MdCS3.2</i>	<i>MdCS3.3</i>	<i>MdCS3.4</i>	<i>MdCS3.5</i>	<i>MdCS3.6</i>	
Transcription related	TATA-box	6	5	10	5	9	16	
	CAAT-box	16	17	31	40	36	29	
Stress related	ARE	4	4	0	4	3	0	
	CAT-box	1	0	3	0	0	3	
	GCN4-motif	0	0	0	1	0	0	
	HD-Zip 1	0	0	0	1	0	0	
	MSA-like	0	0	0	0	1	0	
	W-box	1	0	1	1	0	1	
Hormone response	LTR	1	0	0	1	1	0	
	MBS	4	5	0	1	1	1	
	MYB	3	10	5	11	7	7	
	MYC	3	4	7	6	3	3	
	STRE	2	2	2	2	2	3	
	WUN-motif	0	0	1	0	0	1	
	ABRE	0	0	0	1	1	1	
	ERE	0	0	1	0	0	1	
	GARE-motif	1	1	0	2	2	0	
	TATC-box	0	0	0	0	0	1	
	CGTCA-motif	3	3	1	2	2	3	
	TGACG-motif	2	3	1	2	2	3	
	TCA	0	0	0	1	1	0	
	Photoinduction	G-box	1	1	0	1	1	1
		GT1-motif	1	1	0	2	3	0

境、生长发育、激素应答和光诱导等密切相关的顺式调控元件。*MdCS3.1*、*MdCS3.4*、*MdCS3.5* 这 3 个基因中与逆境反应有关的基因数目最多,说明这 3 个基因在逆境反应中可能发挥着重要的功能;*MdCS3.2*、*MdCS3.4*、*MdCS3.5*、*MdCS3.6* 这几个基因中包含了大量与激素反应有关的顺式作用元件,可能与多种激素反应有关。

## 2.7 苹果 CS3 家族成员组织表达分析

用 Helm 制作热图(图 6),结果表明,所有基因在不同组织中均有表达,其中品种 M67 的花中 *MdCS3.4* 表达量最高,随后依次是 *MdCS3.6*、*MdCS3.3*、*MdCS3.2*、*MdCS3.1* 和 *MdCS3.5*; 品种 M74 的果实中 *MdCS3.4* 表达量最高,随后依次是 *MdCS3.3*、*MdCS3.6*、*MdCS3.2*、*MdCS3.1*、*MdCS3.5*, 品种 M74 的花中 *MdCS3.4* 表达量最高,随

后依次是 *MdCS3.6*、*MdCS3.3*、*MdCS3.2*、*MdCS3.1* 和 *MdCS3.5*; 品种 M20 的果实中 *MdCS3.4* 表达量最高,随后依次是 *MdCS3.6*、*MdCS3.3*、*MdCS3.2*、*MdCS3.1* 和 *MdCS3.5*; 品种 M14 的叶片中 *MdCS3.4* 表达量最高,随后依次是 *MdCS3.3*、*MdCS3.6*、*MdCS3.2*、*MdCS3.1* 和 *MdCS3.5*; 品种 M49 的果实中 *MdCS3.4* 表达量最高,随后依次是 *MdCS3.6*、*MdCS3.3*、*MdCS3.2*、*MdCS3.5* 和 *MdCS3.1*。

## 2.8 苹果 CS3 基因家族成员在不同苹果品种中的表达分析

通过酸碱滴定试验,对‘艾斯达’苹果的果皮和果肉,‘成纪 1 号’的果皮和果肉的酸含量分别进行了测定,结果发现,‘艾斯达’的果皮和果肉的酸含量显著高于‘成纪 1 号’的果皮、果肉(图 7A、7B)。

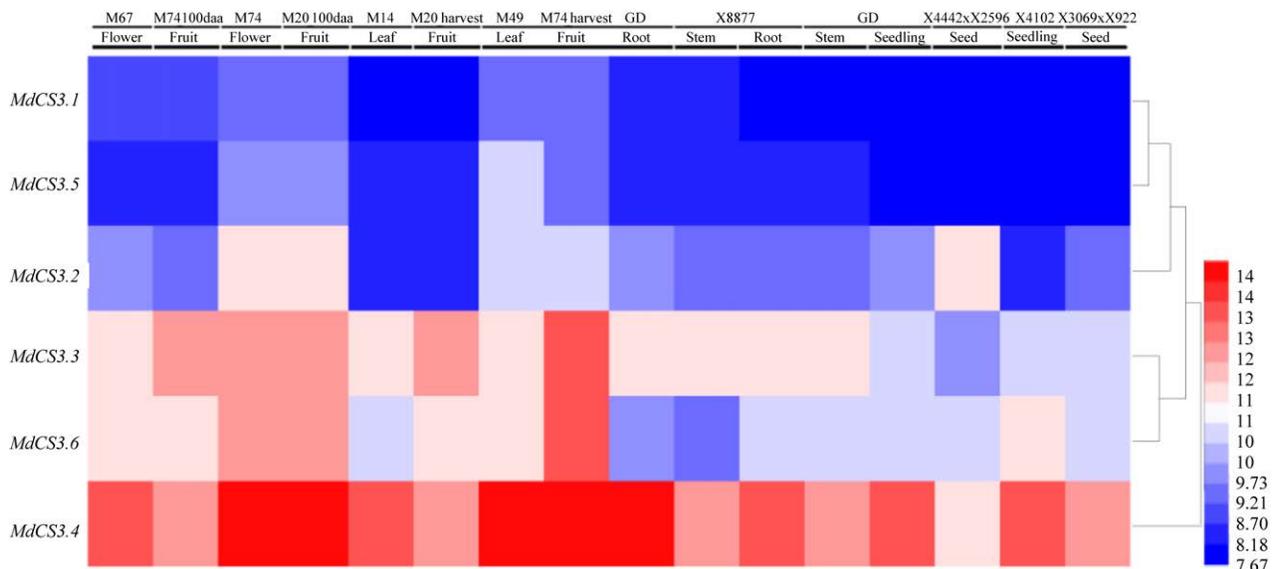


图 6 苹果 CS3 基因家族成员的组织特异性分析

Figure 6 Tissue-specific analysis of CS3 family genes in apple.

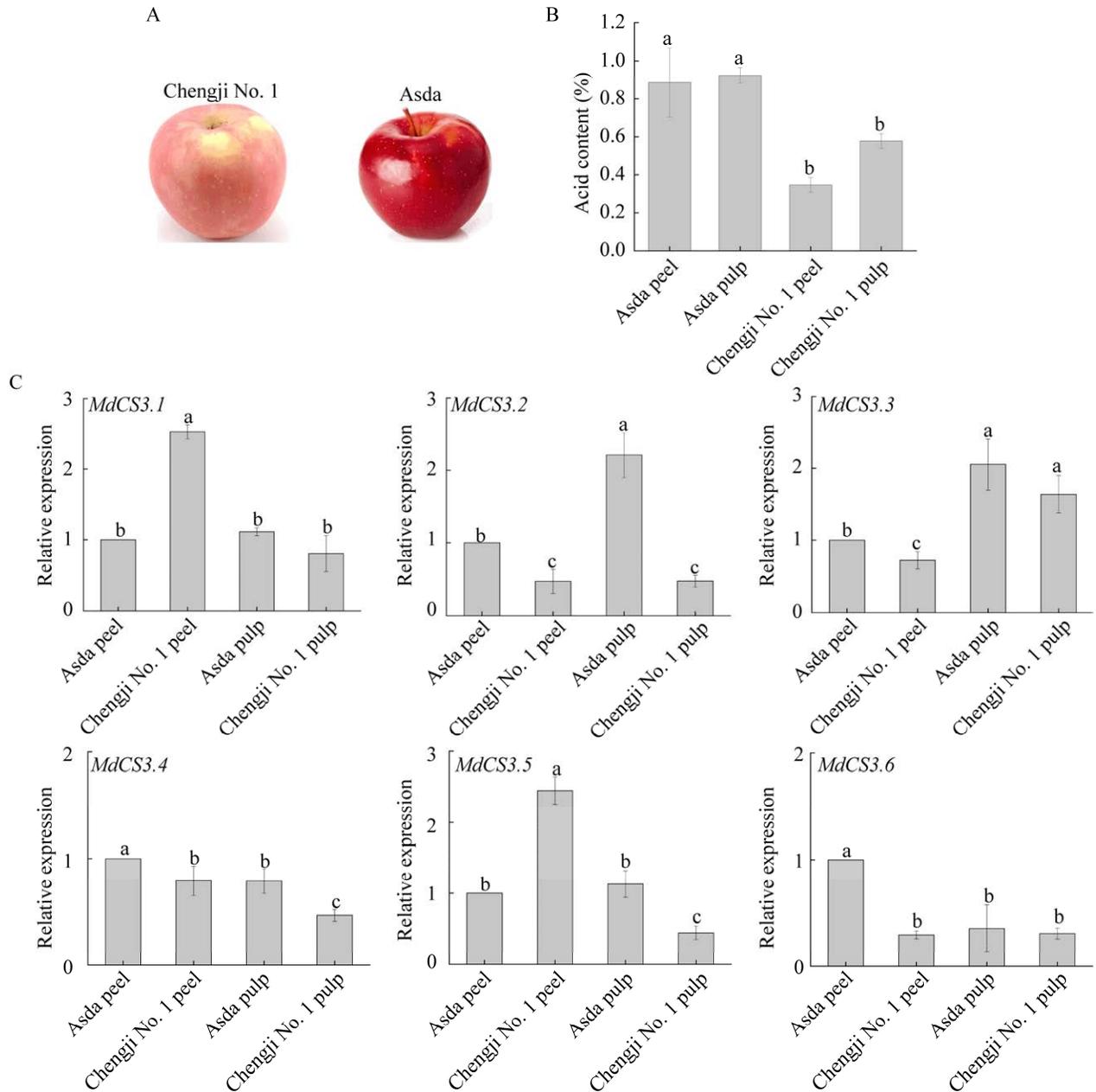


图7 苹果CS3基因家族成员在不同苹果品种中的表达分析 A: 成纪1号和艾斯达苹果的表型. B: 成纪1号和艾斯达苹果果皮和果肉中酸含量的测定分析. C: 苹果CS3基因家族表达分析. 不同小写字母表示显著差异( $P < 0.05$ )

Figure 7 Analysis of the expression of apple CS3 gene family members in different apple varieties. A: Phenotypes of Chengji No.1 and Asda apples. B: Determination and analysis of acid content in peel and pulp of Chengji No.1 and Asda apple. C: Analysis of CS3 gene family expression in apple. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

对不同基因在‘艾斯达’和‘成纪1号’果皮、果肉中的相对表达量进行分析, 结果显示, *MdCS3.1*和*MdCS3.5*在‘成纪1号’果皮中相对表

达量最高, ‘艾斯达’果肉中*MdCS3.2*和*MdCS3.3*基因相对表达量最高, *MdCS3.4*和*MdCS3.6*在‘艾斯达’果皮中的相对表达量高于其果肉和‘成

纪 1 号’的果皮和果肉(图 7C)。

### 3 讨论与结论

CS3 是一个较小的基因家族,该家族已在多个物种中被鉴定,如童晋等<sup>[17]</sup>研究表明 CS 基因参与了油菜植物的代谢调控;胡利华等<sup>[4]</sup>研究证明了 CS 基因参与磷的活化;张珊珊等<sup>[18]</sup>从水稻中获得了柠檬酸合酶基因,间接获得了正确表达的柠檬酸合酶蛋白;迟光红等<sup>[9]</sup>研究发现香蕉中的柠檬酸合酶蛋白定位于乙醛酸循环体。苹果中筛选获得 6 个转录因子家族成员,依次命名为 *MdCS3.1–MdCS3.6*。在进化分析中,可以发现这个基因家族可以被划分成 3 个大类,而苹果家族基因也可以被划分成 3 个亚家族,并且它的氨基酸保守性很高,因此可以推断出,在这些物种中,CS3 基因之间存在着某种相同或者相似的特殊功能。结果表明,苹果中的 CS3 基因家族在遗传上存在着相近的遗传结构。每个基因中都含有 motif 1、motif 2 和 motif 3,且 motif 1 包含的位点较多,由此推测 motif 1 是决定该基因家族功能的关键保守基序。

苹果 CS3 家族含有种类较为丰富的顺式作用元件,如与转录相关的 CAAT-box、厌氧诱导响应元件(antioxidant response element, ARE)、干旱响应元件 MBS (MYB binding site)和光诱导相关的 GT1-motif 等。不同的非生物胁迫因子都在直接或间接影响基因表达水平,通过启动子中顺式作用元件种类及数量对基因表达调控产生影响。不同基因具有不同功能的作用元件,推测 CS3 基因家族在表达调控上具有不同的功能。

果实中的有机酸的积累是一个复杂的过程,有研究表明果实中有机酸的相对含量是果实成熟中的重要组成因子,并且甜度/总酸值是影响苹果果实甜酸风味的一个重要因素<sup>[19]</sup>; Saradhuldhath 等研究表明,菠萝果实发育过程中

酸度的变化是由柠檬酸含量的变化引起的<sup>[20]</sup>;也有研究表明苹果的甜味和酸味取决于总糖和总酸的含量<sup>[21]</sup>;同时苹果果实有机酸的总含量与柠檬酸和苹果酸呈极显著正相关<sup>[22]</sup>,更加表明了苹果酸和柠檬酸是苹果果实酸度的主要决定因子。不同类型果实中有机酸的类型及含量不同,该试验通过对苹果中有机酸含量的测定,对不同苹果果实的分析表明,不同类型苹果有机酸含量有较大差异。推测有机酸含量在不同果实中起到不同的作用,‘艾斯达’苹果和‘成纪 1 号’苹果在风味上有差异,推测有机酸含量在两种苹果生长发育过程中发挥重要作用。

现有研究已经表明柠檬酸合酶基因对植物的耐铝性和对磷的吸收有很大的影响<sup>[6-7]</sup>,同时柠檬酸基因的合成与表达对香蕉、甜橙等果实的生长发育有重要作用<sup>[8-9]</sup>,研究阐述了不同品种的相对表达量不同,调控类型不同,如根系分泌的有机酸在解除根际铝毒害方面的作用<sup>[23]</sup>,已有研究显示,在铝胁迫下,黑麦的根部可分泌出许多有机酸<sup>[24]</sup>,还有一些研究显示,黑麦根尖可分泌柠檬酸和苹果酸<sup>[25]</sup>。通过对 *MdCS3* 家族成员在酸含量不同的苹果果皮和果肉中进行荧光定量试验分析发现, *MdCS3.1* 和 *MdCS3.5* 基因在酸含量最低的‘成纪 1 号’果皮中的表达水平最高,酸含量高的艾斯达果肉中 *MdCS3.2* 和 *MdCS3.3* 基因相对表达水平最高,除 *MdCS3.3* 基因外,其他家族成员在酸含量较低的‘成纪 1 号’果肉中表达水平也相对较低。由此推测, *MdCS3* 基因家族参与了苹果果实酸的积累,不同苹果中酸含量变化趋势与苹果相对表达量变化趋势不同,表明 *MdCS3* 基因在不同苹果品种中的表达模式不同。此外,这些基因的相对表达量也可以反映出它们在不同时间段内的变化情况,为研究苹果果皮和果肉中基因的作用提供了重要的参考。试验结果表明不同品种的苹果 CS3 相对表

达量不同,推测柠檬酸对苹果果实的生长发育也具有重要作用。

本研究利用生物信息学方法筛选鉴定出 6 个苹果 CS3 家族成员,并对该家族成员的结构和功能进行了初步研究,结果发现不同基因在不同酸含量苹果品种中的相对表达量存在差异,说明它们在苹果果实品质形成过程中可能发挥不同作用,但具体作用机制还有待于进一步研究。本研究为 CS3 家族基因在苹果生长发育过程中的功能研究提供了参考。

## REFERENCES

- [1] BORSANI J, BUDDE CO, PORRINI L, LAUXMANN MA, LOMBARDO VA, MURRAY R, ANDREO CS, DRINCOVICH MF, LARA MV. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(6): 1823-1837.
- [2] ETIENNE C, MOING A, DIRLEWANGER E, RAYMOND P, MONET R, ROTHAN C. Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity[J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 114(2): 259-270.
- [3] ETIENNE A, GÉNARD M, LOBIT P, MBEGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, BUGAUD C. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(6): 1451-1469.
- [4] 胡利华, 吴慧敏, 周泽民, 林拥军. 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(CS)导入籼稻品种明恢 86[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(2): 160-166.  
HU LH, WU HM, ZHOU ZM, LIN YJ. Introduction of citrate synthase gene (CS) into an elite indica rice restorer line minghui 86 by a grobacterium-mediated method[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(2): 160-166 (in Chinese)
- [5] 叶思诚, 姚小华, 王开良, 林萍, 龚洪恩, 卓仁英. 油茶柠檬酸合成酶(CS)基因的克隆和表达分析[J]. *植物研究*, 2016, 36(4): 556-564.  
YE SC, YAO XH, WANG KL, LIN P, GONG HE, ZHUO RY. Cloning and expression analysis of citrate synthase (CS) gene in *Camellia oleifera*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, 36(4): 556-564 (in Chinese).
- [6] 王奇峰, 胡清泉, 赵玥, 易琼, 李昆志, 王永雄, 陈丽梅. 光诱导和组成型启动子控制柠檬酸合酶基因过量表达对转基因烟草耐铝性影响的比较[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2011, 37(1): 31-39.  
WANG QF, HU QQ, ZHAO Y, YI Q, LI KZ, YU YX, CHEN LM. Comparison study on effects of overexpressing citrate synthase driven by light-inducible promoter and constitutive promoter on Al tolerance of transgenic tobacco plants[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2011, 37(1): 31-39 (in Chinese).
- [7] 靳苗苗, 杨青川, 金洪, 康俊梅, 龙瑞才. 紫花苜蓿柠檬酸合成酶基因的克隆及对烟草的转化[J]. *草地学报*, 2010, 18(4): 550-555.  
JIN MM, YANG QC, JIN H, KANG JM, LONG RC. Cloning of alfalfa citrate synthase gene and transformation of tobacco[J]. *Acta Agrectir Sinica*, 2010, 18(4): 550-555 (in Chinese).
- [8] 王滕旭, 李正国, 杨迎伍, 邓伟. 甜橙柠檬酸合酶基因的克隆及其表达分析[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(10): 65-69.  
WANG TX, LI ZG, YANG YW, DENG W. Cloning and expression analysis of citrate synthase gene in orange[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(10): 65-69 (in Chinese).
- [9] 迟光红, 周雪丽, 李美英, 徐碧玉, 金志强. 香蕉柠檬酸合酶基因 MaGCS 的克隆及生物信息学分析[J]. *热带农业科学*, 2009, 29(8): 12-18.  
CHI GH, ZHOU XL, LI MY, XU BY, JIN ZQ. Cloning and bioinformatics analysis of banana citrate synthase gene *MaGCS*[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2009, 29(8): 12-18 (in Chinese).
- [10] 赵宝庆, 任伟超, 王震, 李洪源, 徐姣. 酸橙柠檬酸合酶基因电子克隆和生物信息学分析[J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47(12): 79-83.  
ZHAO BQ, REN WC, WANG Z, LI HY, XU J. *In silico* cloning and bioinformatics analysis of citrate synthase gene from *Citrus aurantium*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2019, 47(12): 79-83 (in Chinese).
- [11] 欧金梅, 杨许, 单春苗, 张声祥, 施圆圆, 吴家文, 黄璐琦, 王瑞. 榔梅果实转录组分析及其柠檬酸生物合成途径关键酶基因结构与功能预测[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19): 4606-4616.  
OU JM, YANG X, SHAN CM, ZHANG SX, SHI YY, WU JW, HUANG LQ, WANG R. Transcriptome analysis of "Langmei" fruits and key enzyme genes structure and function prediction involved in citric acid

- biosynthesis[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(19): 4606-4616 (in Chinese).
- [12] IANNETTA PPM, ESCOBAR NM, ROSS HA, SOULEYRE EJF, HANCOCK RD, WITTE CP, DAVIES HV. Identification, cloning and expression analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa*) mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 121(1): 15-26.
- [13] PRACHAROENWATTANA I, CORNAH JE, SMITH SM. *Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination[J]. The Plant Cell, 2005, 17(7): 2037-2048.
- [14] GRZEMSKI W, AKOWSKI JP, KAHN ML. Probing the *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis using temperature-sensitive and impaired-function citrate synthase mutants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions<sup>®</sup>, 2005, 18(2): 134-141.
- [15] 丛俊超, 胡华兵, 王荣华, 刘大丽, 吴则东, 王茂芊. 不同浓度柠檬酸对甜菜种子的引发影响[J]. 中国农学通报, 2022, 38(20): 13-19.  
CONG JC, HU HB, WANG RH, LIU DL, WU ZD, WANG MQ. Effects of different concentrations of citric acid on sugar beet seeds[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(20): 13-19 (in Chinese).
- [16] 乃国洁, 卢世雄, 马维峰, 李艳梅, 陈佰鸿, 毛娟. 葡萄 EIN3/EIL 转录因子家族成员鉴定及表达特征分析[J]. 果树学报, 2021, 38(6): 856-870.  
NAI GJ, LU SX, MA WF, LI YM, CHEN BH, MAO J. Identification and expression characteristics of EIN3/EIL transcription factor family members in grapes[J]. Journal of Pomology, 2021, 38(6): 856-870 (in Chinese).
- [17] 童晋, 詹高森, 王新发, 刘贵华, 华玮, 王汉中. 油菜柠檬酸合酶基因的克隆及在逆境下的表达[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 33-40.  
TONG J, ZHAN GM, WANG XF, LIU GH, HUA W, WANG HZ. Cloning of citrate synthase gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) and its expression under stresses[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(1): 33-40 (in Chinese).
- [18] 张珊珊, 明凤, 路群, 郭滨, 沈大棱. 水稻柠檬酸合酶编码基因的初步研究[J]. 中国水稻科学, 2005, (6): 501-505.  
ZHANG SS, MING F, LU Q, GUO B, SHEN DL. Molecular cloning and characterization of citrate synthase gene in rice (*Oryza sativa*)[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2005, (6): 501-505 (in Chinese).
- [19] 梁俊, 郭燕, 刘玉莲, 李敏敏, 赵政阳. 不同品种苹果果实中糖酸组成与含量分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10): 163-170.  
LIANG J, GUO Y, LIU YL, LI MM, ZHAO ZY. Analysis of contents and constituents of sugar and organic acid in different apple cultivars[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2011, 39(10): 163-170 (in Chinese).
- [20] SARADHULDHAT P, PAULL RE. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(3): 297-303.
- [21] MA BQ, YUAN YY, GAO M, LI CY, OGUTU C, LI MJ, MA FW. Determination of predominant organic acid components in *Malus* species: correlation with apple domestication[J]. Metabolites, 2018, 8(4): 74.
- [22] LÓPEZ ML, VILLATORO C, FUENTES T, GRAELL J, LARA I, ECHEVERRÍA G. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady'<sup>®</sup> apples stored in different conditions[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 43(1): 55-66.
- [23] KOCHIAN LV, PIÑEROS MA, HOEKENGA OA. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. Plant and Soil, 2005, 274(1/2): 175-195.
- [24] LI XF, MA JF, MATSUMOTO H. Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye[J]. Plant and Soil, 2002, 242(2): 235-243.
- [25] 凌桂芝, 石保峰, 黄永禄, 李耀燕, 王永雄, 黎晓峰. 铝胁迫下黑麦根尖分泌有机酸和钾离子的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(4): 893-898.  
LING GZ, SHI BF, HUANG YL, LI YY, YU YX, LI XF. Secretion of organic acid anions and potassium from root apices under Al stress in *Secale cereale* L.[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(4): 893-898 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)